

**Charakterisierung verschiedener Cytochrome P-450 in
Lebermikrosomen nach Vorbehandlung von Versuchs-
tieren mit Enzyminduktoren und ontogenetische
Analyse des Rezeptors für die Induktion mit
polycyclischen Kohlenwasserstoffen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor
der Naturwissenschaft"
am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg-Universität
in Mainz

Donata E. Friederici
geboren in Köln

Mainz 1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Charakterisierung verschiedener Cytochrome P-450 in
Lebermikrosomen nach Vorbehandlung von Versuchs-
tieren mit Enzyminduktoren und ontogenetische
Analyse des Rezeptors für die Induktion mit
polycyclischen Kohlenwasserstoffen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades

"D o k t o r

d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t "

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Donata E. Friederici

geboren in Köln

Mainz 1980

Dekan:

Prof. Dr. H. Risler

Berichterstatter:

Prof. Dr. G. F. Kahl

Prof. Dr. K. Urich

Tag der mündlichen Prüfung: 8.7.1980

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmakologischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. K. Urich möchte ich für die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Biologie und für hilfreiche Kritik bei der schriftlichen Abfassung recht herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G.F. Kahl, Pharmakologisches Institut, für die Vergabe des Themas und die intensive Anleitung bei der Bearbeitung der Problematik.

Dr. D.W. Nebert, Developmental Pharmacology Branch, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, bin ich für die Einladung in seine Arbeitsgruppe sehr dankbar.





Liste der verwendeten Abkürzungen

ACh	Acetanilid-4-Hydroxylase
AHH	Arylhydrocarbon-Hydroxylase, Benzpyren-Hydroxylase
B 6	responsiver Mäuse-Reinzuchtstamm C57 BL/6N
BNF	β -Naphthoflavon
BP	Benzpyren (Benz- α -pyren)
CH	Cycloheximid
HEPES	4-(2-Hydroxyäthyl)-1-Piperazin-Äthansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
KG	Körpergewicht
K _S	apparente Bindungskonstante
MC	3-Methylcholanthren
MP	Metyrapon
3-OH-BP	3-Hydroxy-Benzpyren
P-450	Cytochrom P-450 bezeichnet in der vorliegenden Arbeit die Gesamtheit aller Formen von membrangebundenem Hämoprotein, das mit NADPH-abhängigen Monooxygenase-Aktivitäten assoziiert ist und im reduzierten Zustand CO binden kann.
PB	Phenobarbital
PCN	Pregnenolon-16 α -Carbonitril
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin

I n h a l t

1.	E i n l e i t u n g	1
2.	M a t e r i a l u n d M e t h o d e n	28
2.1.	Chemikalien	28
2.2.	Versuchstiere und Tierhaltung	31
2.3.	Vorbehandlung der Tiere	32
2.4.	Präparation der Mikrosomen- und Cytosolfraktion	35
2.5.	Proteinbestimmung	37
2.6.	Spektralanalytische Messungen	38
2.7.	Enzymatische Reaktionen	41
2.7.1.	Durch mikrosomale Monooxygenasen vermittelte Hydroxylierungsreaktionen	41
2.7.2.	Durch mikrosomale Monooxygenasen vermittelte Desalkylierungsreaktionen	46
2.7.3.	Bestimmung der Epoxidhydratase-Aktivität	48
2.8.	Analyse des cytosolischen TCDD-Rezeptors	49
2.9.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.9.1.	Herstellung der Gele	51
2.9.2.	Quantitative Auswertung der Gele	53
2.9.3.	Spezialgele zur Bestimmung des Hämoproteinbereichs	53
2.10.	Statistik	54
3.	E r g e b n i s s e	55
3.1.	Zeitverlauf eine durch Cycloheximid verzögerten Methylcholanthren-Induktion: Ausprägung induktorspezifischer gelelektrophoretischer, spektraler und enzymatischer Parameter	55
3.1.1.	Gelelektrophoretische Veränderungen	55
3.1.2.	Spektrale Veränderungen	62
3.1.3.	Änderungen der Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität	64
3.1.4.	Korrelationen	65
3.2.	Zeitverlauf der induktiven Veränderungen nach einer Einzeldosis von 3-Methylcholanthren	68
3.2.1.	Gelelektrophoretische Veränderungen	68
3.2.2.	Spektrale Veränderungen nach Einzelinduktion mit 3-Methylcholanthren	69
3.2.3.	Enzymatische Veränderungen	74

3.3.	Zeitverlauf der Induktion nach einer Einzeldosis von Phenobarbital	78
3.3.1.	Gelelektrophoretische Veränderungen	78
3.3.2.	Spektrale Veränderungen nach Einzelinduktion mit Phenobarbital	79
3.3.3.	Enzymatische Veränderungen	81
3.4.	Zeitverlauf einer Mischinduktion mit 3-Methylcholanthren und Phenobarbital	82
3.4.1.	Gelelektrophoretische Veränderungen nach Mischinduktion mit 3-Methylcholanthren und Phenobarbital	82
3.4.2.	Spektrale Veränderungen	83
3.4.3.	Enzymatische Veränderungen nach Mischinduktion mit 3-Methylcholanthren und Phenobarbital	85
3.5.	Korrelationen (Einzeldosis-Studie)	86
3.6.	Untersuchungen zur ontogenetischen Entwicklung des cytosolischen Rezeptors der Cytochrom P-450-Induktion durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe	89
3.6.1.	Ontogenetische Ausprägung des Gehalts an cytosolischem Rezeptor in der Leber	89
3.6.2.	Ontogenetische Ausprägung der Induzierbarkeit von Arylhydrocarbon-Hydroxylase und Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivitäten	97
3.6.3.	Entwicklung der Ausstattung mit Cytochrom P-450	100
3.6.4.	Entwicklung gelelektrophoretischer Korrelate von mikrosomalen Proteinen	102
3.7.	Induktive Wirkung von Clotrimazol auf die Rattenleber	106
3.8.	Induktiver Einfluß einiger neuentwickelter Antimykotika (Clotrimazol-Analoga) auf die Rattenleber	112
3.9.	Induktive Wirkung von Metyrapon und Pregnenolon-16 α -Carbonitril	119
3.10.	Untersuchung von Äthanol und Rifampicin als Induktoren	126
4.	D i s k u s s i o n	130
4.1.	Gelelektrophoretische Korrelate der durch Phenobarbital und durch polycyclische Kohlenwasserstoffe induzierbaren Cytochrom P-450-Formen	130
4.2.	Ontogenese des TCDD-Rezeptors	142

4.2.	Ontogenese des TCDD-Rezeptors	142
4.3.	Induktionsmuster nach Behandlung mit alternativen Induktoren	145
5.	Zusammenfassung	158
6.	Literaturverzeichnis	163

1. Einleitung

Ein Organismus ist zeit seines Lebens der Belastung durch eine Vielzahl sehr verschiedenartiger Fremdstoffe ausgesetzt, die nicht in den Intermediärstoffwechsel eingehen und daher zur Vermeidung einer Akkumulation ausgeschieden werden müssen.

Voraussetzung für die Ausscheidung von Pharmaka und Fremdstoffen ist in vielen Fällen eine enzymatische Umwandlung mit dem Ziel, die ursprünglich lipophile Substanz hydrophiler und somit leichter ausscheidbar zu machen.

Die wichtigsten für diese Reaktion verantwortlichen Enzyme sind im glatten endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle lokalisiert. Sie zeichnen sich durch eine sehr geringe Substratspezifität aus und sind in der Lage, Substanzen mit den unterschiedlichsten chemischen Strukturen zu metabolisieren: Neben lipidlöslichen Fremdstoffen, zu denen Insektizide, Herbizide, Nahrungsmittelzusätze (Geschmacksstoffe und Konservierungsmittel), Umweltgifte und viele Pharmaka gehören, werden auch körpereigene Substanzen wie z.B. Steroide, Fettsäuren und Gallensäuren oxidativ umgesetzt. Dieser Metabolisierungsprozeß kann Inaktivierung oder Aktivierung, Entgiftung oder Giftung bedeuten: So kann aus der wirksamen Form eines Arzneimittels ein unwirksamer Metabolit (Barbiturate $\rightarrow$ Hydroxybarbiturate) oder aus der unwirksamen Verbindung erst die eigentlich wirksame Substanz entstehen (Sulfachrysoidin $\rightarrow$ Sulfanilamid, Imipramin $\rightarrow$ Desmethylimipramin). Ursprünglich reaktionsträge Substanzen, zu denen u.a. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe zu zählen sind, können in oft hochgiftige, z.T. auch mutagene und karzinogene Verbindungen umgewandelt, also metabolisch aktiviert werden (Gillette et al., 1974). Den

mikrosomalen pharmakon- und fremdstoffabbauenden Enzymen ist daher keine allgemeine Schutzfunktion im Sinne eines Entgiftungsmechanismus zuzuschreiben, sondern ihre Funktion ist primär auf eine Verbesserung der Ausscheidung exogener und endogener lipophiler Stoffe gerichtet. Bei diesen Vorgängen spielen zwei generell unterschiedliche Klassen von Reaktionen eine Rolle, die als Reaktionen der Phase I und der Phase II bezeichnet werden. In der ersten Phase erfolgen strukturverändernde metabolische Umwandlungen durch Oxidation (die auf sehr unterschiedlichen Reaktionswegen erfolgen kann), Reduktion und Hydrolyse. In der zweiten Phase kann dann nach den vorausgegangenen Veränderungen durch die Enzyme der Phase I (Einführen oder Freilegen funktioneller Gruppen) eine Kopplung (Konjugation) mit bestimmten aus dem Intermediärstoffwechsel stammenden Resten wie Glucuronsäure, Schwefelsäure, Aminosäuren oder Glutathion erfolgen.

Membrangebundene Enzymsysteme, die die Biotransformation körpereigener und körperfremder Substanzen katalysieren, sind in nahezu allen Geweben vertreten: u.a. in Niere, Lunge, Haut, Intestinum, Nebennierenrinde, Gehirn und Blut. Für den Fremdstoffmetabolismus aber kommt den im endoplasmatischen Retikulum der Hepatocyten lokalisierten Enzyme die größte Bedeutung zu (Conney, 1967). Das präparatorische Korrelat dieses Membransystems stellen die Mikrosomen dar, die durch differentielle Zentrifugation von Leberhomogenaten von den übrigen Zellbestandteilen separiert und als Sediment des Ultrazentrifugationsschrittes (100 000 x g) gewonnen werden. Elektronenmikroskopisch sind sie als 100 - 300 nm große vesikelförmige Gebilde zu erkennen (Bargmann, 1964). Die Membranfragmente enthalten noch die intakten Enzymsysteme des in seinem morphologischen Aufbau zerstörten endoplasmatischen Retikulums und sind - in vivo - vornehmlich zum oxidativen Abbau von

Fremdstoffen befähigt, können aber auch hydrolysierte oder reduzierte Metabolite bilden, Epoxide in Dihydrodiole umwandeln und nach Zusatz des Cofaktors Uridindiphosphoglucuronat die Glucuronidierung vermitteln.

Die erste Beschreibung der Metabolisierung eines Fremdstoffes (4-Dimethylamino-azobenzol, "Buttergelb") durch Lebermikrosomen geht auf Mueller und Miller (1949) zurück. Die Autoren konnten zeigen, daß die mikrosomale Fraktion von Leberhomogenat sowohl die reduktive Spaltung der Azo-Bindung als auch die oxidative N-Demethylierung von Aminoazo-Farbstoffen katalysiert. 1955 demonstrierten Brodie et al., daß das mikrosomale Enzymsystem auch für den Metabolismus verschiedener Pharmaka verantwortlich ist, und Mitoma und Mitarbeiter (1956) stellten fest, daß ebenso die Hydroxylierung einer Reihe aromatischer Verbindungen in diesen isolierten Membranen abläuft.

Für den oxidativen Abbau in Mikrosomen steht eine Vielzahl z.T. sehr unterschiedlicher chemischer Reaktionswege zur Verfügung (Boyland, 1950; Brodie et al., 1958; Gillette, 1963, 1966):

1. Aromatische Ringhydroxylierung
z.B. Acetanilid $\longrightarrow$ p-Hydroxyacetanilid
2. Aliphatische Hydroxylierung
z.B. ω -Hydroxylierung von Fettsäuren
3. Epoxidierung z.B. Benzo[a]pyren $\longrightarrow$ Benzo[a]pyren-4,5-Oxid
4. N-Desalkylierung
z.B. Aminopyrin $\longrightarrow$ 4-Aminoantipyrin
5. O-Desalkylierung
z.B. Codein $\longrightarrow$ Morphin
6. Desaminierung
z.B. Amphetamin $\longrightarrow$ Phenylaceton

7. N-Oxidation

z.B. Anilin $\longrightarrow$ N-Phenylhydroxylamin

8. Sulfoxidation

z.B. Chlorpromazin $\longrightarrow$ Chlorpromazin-Sulfoxid

Bei derartigen Oxidationsvorgängen sind sowohl Reduktionsäquivalente in Form von NADPH als auch molekularer Sauerstoff erforderlich (Brodie et al., 1955; Mitoma et al., 1956; Gillette et al., 1957). Der Befund, daß jeweils nur ein Sauerstoffatom in das Substrat (R) eingebaut und das andere zu Wasser reduziert wird ($H^+ + R-H_2 + NADPH + O_2 \longrightarrow R-HOH + NADP^+ + H_2O$), klassifiziert die Enzyme derartiger Abbaureaktionen ihrer Doppelfunktion wegen (Oxidation des Substrats und Reduktion des Sauerstoffs) nach der Definition von Mason (1957) als mischfunktionelle Oxidasen (MFO) bzw. in der Terminologie von Hayaishi (1964) als Monooxygenasen. Posner et al. (1961) konnten unter Verwendung von $^{18}O_2$ bzw. $H_2^{18}O$ auf direktem Wege demonstrieren, daß der zur Oxidation (von Acetanilid) benötigte Sauerstoff der Luft und nicht dem Wasser entstammt.

Schlüsselenzym dieses mikrosomalen Oxidationssystems, das in mancher Hinsicht in seinem Aufbau der mitochondrialen Atmungskette ähnelt, ist das von Klingenberg und Garfinkel 1958 entdeckte Cytochrom P-450, an dessen aktives Zentrum das Substrat bindet (Imai und Sato, 1966; Remmer et al., 1966) und das als Endoxidase fungiert (Cooper et al., 1965; Omura et al., 1965a).

Die Fähigkeit, in reduziertem Zustand einen Komplex mit Kohlenmonoxid zu bilden, der im Differenzspektrum durch ein Absorptionsmaximum bei 450 nm auffällt – eine für Hämoproteine ungewöhnliche spektrale Eigenschaft – hat zur Entdeckung des Cytochrom P-450 als "CO-bindendes Pigment" (Klingenberg, 1958; Garfinkel,

1958) geführt, bevor seine eigentliche Funktion bekannt war. Omura und Sato (1962) konnten dieses Pigment als Hämoprotein vom b-Typ charakterisieren und prägten aufgrund seiner oben beschriebenen spektralen Besonderheit den Begriff "Cytochrom P-450". Das ausgeprägte Absorptionsmaximum bei 450 nm ermöglichte eine leichte Identifizierung des Cytochroms in den mikrosomalen Membranen (auch in Gegenwart anderer membrangebundener Hämoproteine), und das Ausmaß der Absorption erlaubt eine einfache Quantifizierung des Cytochrom P-450-Gehalts.

Neben dem Cytochrom P-450, das in diesem System die zentrale Rolle spielt, ist für das Ablaufen der Monooxygenase-Reaktionen ein Flavoprotein – die NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase (oder NADPH Cytochrom c-Reduktase) – erforderlich, das die Oxidation von NADPH katalysiert und die Reduktionsäquivalente zur Bildung von H_2O liefert. Vermutlich bilden mehrere Moleküle Cytochrom P-450 einen mehr oder weniger festen Komplex mit einem Molekül der Reduktase (Estabrook, 1971; Yang, 1977). Außerdem muß die Anwesenheit bestimmter Phospholipide, vor allem Phosphatidylcholin, garantiert sein (Strobel et al., 1970). Wie durch Rekonstitution des Systems aus den gereinigten Einzelkomponenten von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (Lu und West, 1972; Lu et al., 1973; Levin et al., 1974; v.d. Hoeven und Coon, 1974; Imai und Sato, 1974), sind die drei genannten Komponenten Cytochrom P-450, NADPH-Cytochrom c-Reduktase und Phosphatidylcholin neben NADPH und Sauerstoff für ein ungestörtes Ablaufen der Oxidationsprozesse unbedingt erforderlich.

Welche Rolle ein in der Membran benachbart lokalisiertes Hämoprotein, das Cytochrom b_5 (Strittmatter und Ball, 1954), dessen Funktion zunächst als zusätzliche Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten interpretiert wurde (Hildebrandt und Estabrook, 1971) und ein zugehöriges Flavoprotein, die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase

(Williams und Kamin, 1962), bei der Monooxygenierung spielen, ist noch nicht endgültig geklärt.

In engem Zusammenhang mit den mikrosomalen Monooxygenasen steht die Epoxidhydratase; sie kann die Aktivierung von Präkarzinogenen in zweierlei Hinsicht entscheidend beeinflussen. Noch vor wenigen Jahren hatte man die biologische Bedeutung dieses Enzyms in erster Linie in der Eliminierung von hochreaktiven elektrophilen Epoxid-Intermediärprodukten gesehen (Oesch, 1973), die häufig durch Monooxygenierung aus polycyclischen Aromaten entstehen und leicht kovalent an nucleophile Zellkomponenten wie DNA, RNA und Proteine binden können (Brookes und Lawley, 1964; Grover und Sims, 1968, Gelboin et al., 1969; Capdevila et al., 1975; Kahl et al., 1977a). Derartige Epoxidierungsreaktionen werden heute als initialer Schritt bei der Bildung von ultimatsten Karzinogenen angesehen.

Das ubiquitäre Umweltgift Benzpyren (BP) wird durch Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen zu verschiedenen elektrophilen Zwischenprodukten metabolisiert, die sich entweder spontan in Phenole umwandeln können oder durch die Epoxidhydratase zu Dihydrodiolen umgesetzt werden (Oesch und Daly, 1972). Diese Metabolite können ein zweites Mal als Substrat für Monooxygenasen dienen; dabei wird das als ultimates Karzinogen angesehene 7,8-Diol-9,10-epoxid gebildet (z.B. Huberman et al., 1976; Osborne et al., 1976; Wood et al., 1976; Kapitulnik et al., 1978). Der Epoxidhydratase kommt also beim Stoffwechsel von Präkarzinogenen eine duale, teils entgiftende und teils aktivierende Funktion zu.

1965 beobachteten Conney und Mitarbeiter als Folge einer Behandlung von Ratten mit dem polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoff 3-Methylcholanthren (MC) gesteigerte Aktivitäten bestimmter mikrosomaler Monooxygenasen beim Abbau von Aminoazo-Farbstoffen, ein Effekt, den sie auf Enzyminduktion zurück-

führten. Remmer stellte 1959 in Rattenlebermikrosomen einen in ähnlicher Weise beschleunigten oxidativen Abbau von Arzneimitteln unter dem Einfluß von Phenobarbital (PB) fest, den er ebenfalls durch eine erhöhte Synthese mikrosomaler Enzyme erklärt. Morphologisch kommen diese Veränderungen als eine im elektronenmikroskopischen Bild nachweisbare verstärkte Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums zum Ausdruck (Remmer und Merker, 1963; 1963a; Fouts und Rogers, 1965). Kato et al. (1965) konnten diese Beobachtung durch Anwendung biochemischer Methoden bestätigen: Sie fanden nach PB-Behandlung einen erhöhten Einbau von [^{14}C]-Leucin nur in mikrosomales Protein, ein Befund, den Levin und Kuntzman (1969) – ebenfalls durch Einsatz radioaktiv markierter Präkursoren – als Stimulation mikrosomaler Hämoproteinsynthese spezifizieren konnten. MC steigert in ähnlicher Weise, aber in erheblich schwächerem Umfang die Synthese von mikrosomalem Protein (Kato et al., 1965; 1966). Parallelverlaufend mit den Zunahmen der für den Fremdstoffmetabolismus verantwortlichen Enzymaktivitäten erfolgt ein Anstieg des Gehalts an Cytochrom P-450, der als entscheidender Faktor für die Stimulation angesehen wird (Remmer et al., 1968). Andere mit dem System in Zusammenhang stehende Membrankomponenten wie Cytochrom b_5 und die Cytochrom b_5 -Reduktase unterliegen dagegen nur sehr geringfügigen Veränderungen.

Die metabolische Aktivität des mikrosomalen Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenase-Systems ist, wie man inzwischen weiß, durch eine fast unüberschaubare Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher Substanzen, die zum großen Teil selbst als Substrate für diese Enzyme dienen, stimulierbar (z.B. Conney, 1967).

Aufgrund unterschiedlicher Induktionseffekte, die die getesteten Substanzen hervorrufen, nahm man (zunächst) eine Einteilung der Induktoren in zwei Klassen vor,

als deren Hauptvertreter MC und PB angesehen wurden (Conney, 1967), eine Einteilung, die letztlich auf Forschungsinteressen der 50er Jahre begründet ist, bei denen Krebsentstehung und Barbiturattoleranz im Vordergrund standen.

Während die der MC-Gruppe angehörenden Substanzen überwiegend polycyclische Kohlenwasserstoffe darstellen, zu denen eine Reihe hochtoxischer und zum Teil karzinogener Verbindungen zu rechnen sind, läßt sich für Induktoren vom PB-Typ, dem unter anderem die meisten der induzierenden Pharmaka zugeordnet werden, weder chemisch noch hinsichtlich ihrer pharmakologischen Wirkung eine allgemeine Charakterisierung vornehmen. Einzige Gemeinsamkeit aller Induktoren ist ein lipophiler Charakter des Moleküls, der eine Anreicherung in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums begünstigt.

Mit verschiedenen Methoden lassen sich die Unterschiede der Veränderungen, die eine Behandlung von Versuchstieren mit PB oder mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen wie MC, Benzpyren (BP) oder β -Naphthoflavon (BNF) im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle bewirkt, verdeutlichen. So stellten Alvares et al. (1967) bei der spektralen Untersuchung von Mikrosomen aus MC-induzierten Rattenlebern eine Blauverschiebung des reduzierten Cytochrom P-450-Komplexes mit einem Absorptionsmaximum bei 448 nm fest und werteten diese Veränderung als Hinweis auf die Bildung einer eigenen Cytochrom P-450-Form, der sie die Bezeichnung "Cytochrom P-448" gaben. (Sladek und Mannering hatten 1966 das nach MC-Behandlung vorliegende Cytochrom P-450 aufgrund enzymatischer Befunde zur Unterscheidung vom PB-induzierten Typ "Cytochrom P₁-450" genannt.)

Bei weiteren Tierspezies wie Maus (Nebert et al., 1972) und Kaninchen (Hildebrandt et al., 1968) und auch in

Zellkulturen (Nebert, 1969; 1970) waren vergleichbare spektrale Effekte nach Induktion mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse erbrachte auch die spektrale Untersuchung teilgereinigter Cytochrom P-450-Fraktionen aus MC-induzierten Lebern (Fujita und Mannering, 1971; Levin et al., 1972). Der beschriebene Effekt ist weder auf eine Anwesenheit des Induktors im Untersuchungsansatz zurückzuführen (Jefcoate und Gaylor, 1969), noch ist eine derartige spektrale Verschiebung des Cytochrom P-450-CO-Komplexes durch in-vitro-Zugabe von MC provozierbar (Alvares et al., 1971).

Weitere spektrale Differenzierungsmöglichkeiten zwischen den nach PB- oder MC-Induktion vorliegenden Cytochrom P-450-Populationen bieten Bindungsstudien mit Liganden wie beispielsweise Metyrapon (MP), das an reduziertes Cytochrom P-450 bindet und im Differenzspektrum ein Absorptionsmaximum bei 446 nm erzeugt (Hildebrandt et al., 1969). Die Affinität für das Pyridin-Derivat wird durch PB-Vorbehandlung auffällig erhöht, während unter dem Einfluß von MC – bedingt durch einen starken Affinitätsverlust – die apparente Bindungskonstante (K_s) für MP erheblich ansteigt (Jonen et al., 1974).

Auch auf enzymatischer Ebene ergeben sich deutliche Unterschiede bezüglich der Induktionseffekte der beiden Induktor-Prototypen MC und PB: Während PB ein relativ breites Spektrum verschiedener Enzymreaktionen stimuliert (neben oxidativem und reduktivem Abbau einer Vielzahl von Pharmaka auch die Diolbildung aus Epoxiden sowie Glucuronidierungsreaktionen), sind die nach Vorbehandlung mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen induzierten Enzymaktivitäten vergleichsweise begrenzt (vergl. Conney, 1967).

Als besonders charakteristisch für eine PB-Induktion werden beispielsweise eine Zunahme der Seitenketten-Hydroxylierung von Hexobarbital und Pentobarbital (Conney, 1960) und eine erhöhte N-Demethylierungsrate von Äthylmorphin (Sladek und Mannering, 1969) angesehen, denn durch MC sind diese Enzymaktivitäten nicht stimulatativ zu beeinflussen.

Typisch für die Induktion mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen sind dagegen unter anderem auffällig gesteigerte Aktivitäten der Acetanilid-Hydroxylase (Conney, 1967) und der Arylhydrocarbon-(AHH-) oder Benzpyren-Hydroxylase (Alvares et al., 1968). Zwar kann auch PB eine schwache Zunahme der Benzpyren-Hydroxylierung bewirken, aber die Aktivitätssteigerung nach MC-Behandlung ist um ein Vielfaches höher. Außerdem konnte durch enzymkinetische Untersuchungen sichergestellt werden, daß die nach MC- bzw. PB-Induktion vorliegenden Enzymformen unterschiedliche Affinitäten für das Substrat besitzen (Conney, 1972) und sich somit als verschieden ausweisen. Die gesteigerte Aktivität der nach PB-Behandlung vorliegenden AHH-Form, die in ihren Substratbindungseigenschaften (K_M) der Kontrollform gleicht, wird auf eine unspezifische, mit der ausgeprägten Proliferation des endoplasmatischen Reticulums nach PB-Behandlung einhergehende generell gesteigerte Synthese mikrosomaler Proteine zurückgeführt.

Überschneidungen der Stimulationseffekte, die von den beiden Induktor-Prototypen ausgehen, sind auch bei anderen Monooxygenasereaktionen zu beobachten; allerdings ist meist ein gradueller Unterschied bezüglich der Aktivitätssteigerung erkennbar. So nimmt z.B. die O-Deäthylierungsrate von 7-Äthoxycoumarin nach Vorbehandlung von Ratten sowohl mit PB als auch mit MC deutlich zu, die induzierende Wirkung des Aromaten ist jedoch etwa doppelt so stark ausgeprägt (Ullrich et al., 1975).

Für den oxidativen Abbau von Biphenyl, der hauptsächlich durch Einführung einer Hydroxylgruppe in para- (4-) oder in ortho- (2-) -Position des Moleküls erfolgt (Mitoma et al., 1956), wurde von Creaven und Mitarbeitern (1965) die Existenz zweier verschiedener Enzyme postuliert, deren unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Induktortypen später nachgewiesen werden konnte (Creaven und Parke, 1966). Die Aktivität der 4-Hydroxylase steigt bei Ratten nach Vorbehandlung mit PB auf das Doppelte an, während nach Gabe von polycyclischen Kohlenwasserstoffen wie MC und Benzpyren (BP) keine vermehrte Bildung von 4-Hydroxy-Metaboliten zu erreichen ist. Dagegen wird die 2-Hydroxylierung von Biphenyl, auf die PB nur einen geringen Einfluß hat, durch MC und BP um ein Vielfaches gesteigert.

Durch Reinigung von Cytochrom P-450-Formen aus Lebern unterschiedlich vorbehandelter Versuchstiere konnte auf molekularer Ebene der direkte Beweis erbracht werden, daß durch PB- bzw. MC-Induktion in der Tat verschiedene Cytochrome P-450 induziert werden, die sich außer in ihrer enzymatischen Aktivität und ihrem spektralen Verhalten auch im gelelektrophoretisch ermittelten Molekulargewicht ihrer Untereinheiten deutlich voneinander unterscheiden (Alvares und Siekewitz, 1973; Hashimoto und Imai, 1976; Haugen und Coon, 1976; Huang et al., 1976; Thomas et al., 1976; Johnson und Muller-Eberhardt, 1977). Immunologisch konnte die "Individualität" dieser gereinigten PB- bzw. MC-typischen Cytochrom P-450-Formen anhand von Präzipitationsreaktionen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (z.B. Thomas et al., 1976).

Gereinigtes Cytochrom P-450 aus Kaninchenlebern, dessen Molekulargewicht durch Gelfiltration und Ultrazentrifugation mit 270 000 bzw. 280 000 Dalton bestimmt wurde (v.d. Hoeven und Coon, 1974), wird durch SDS-Behandlung

in Untereinheiten zerlegt (Welton und Aust, 1974), die sich in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich zwischen ca. 40 000 und 60 000 Dalton darstellen (z.B. Ryan et al., 1975). PB-Vorbehandlung bewirkt den Anstieg einer leichteren Bande, deren Molekulargewicht speziesabhängig variiert und zwischen etwa 48 000 und 52 000 Dalton liegt (z.B. Alvares und Siekewitz, 1973; Imai und Sato, 1974; Thomas et al., 1976; Haugen und Coon, 1976), während nach Induktion mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen die Zunahme von Banden mit höherem Molekulargewicht (zwischen 54 000 und 57 000 Dalton) beobachtet wird (z.B. Alvares und Siekewitz, 1973; Thomas et al., 1976; Atlas et al., 1977).

Zunächst wurde in Lebermikrosomen nach Vorbehandlung mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen wie MC oder β -Naphthoflavin (BNF) bei verschiedenen Tierarten der Anstieg einer induktortypischen Bande gefunden (z.B. Alvares und Siekewitz, 1973; Welton und Aust, 1974; Ryan et al., 1975). Bessere Trennverfahren ermöglichten jedoch wenig später bei Mäusen (Boobis et al., 1977) und Ratten (Kahl et al., 1977) die Differenzierung von zwei induktortypischen Banden, deren apparente Molekulargewichte nur um wenige 1000 Dalton differieren.

Haugen und Mitarbeiter konnten 1976 anhand von Untersuchungen über den Einbau von [^{14}C]- und [^3H]-Leucin in mikrosomale Leberproteine bei Mäusen zeigen, daß die erhöhte Bildung von Cytochrom P-448 und Cytochrom P-450 nach BNF- bzw. PB-Induktion in erster Linie Ergebnisse einer *de novo*-Synthese von mikrosomalem Protein darstellt und nicht oder nur zu einem geringen Teil auf einen verminderten Abbau oder einer Umformung bereits vorhandener Polypeptide zurückzuführen ist. Letztere sind Vorgänge, die einen echten Induktionseffekt im engeren Sinne nur vortäuschen könnten (vergl. Schimke, 1964; Berlin und Schimke, 1965). Durch

Anwendung von Proteinsynthese-Hemmstoffen wie Actinomycin D, Puromycin oder Cycloheximid (CH) kann die Induktion von Cytochrom P-450 verhindert werden, wie verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt haben (Conney und Gilman, 1963; Gelboin und Blackburn, 1964; Ernster und Orrenius, 1965; Gelboin, 1971; Jacob et al., 1974).

Auf einem völlig anderen Wege konnte die Unterschiedlichkeit der bei den Cytochromformen mit Hilfe genetisch verschiedener Mäuse-Reinzuchtstämme demonstriert werden: Bei bestimmten Mutantenstämmen, sogenannten "nicht responsiven" Mäusen (nonresponsive, DBA/2N-, D2-Mäuse), ist nämlich durch Behandlung mit Induktoren wie BNF, MC oder Benzpyren weder die für diese Substanzen sonst typische Erhöhung der AHH-Aktivität noch eine spektrale Blauverschiebung des Cytochrom P-450-CO-Komplexes zu erreichen (z.B. Nebert et al., 1971; Gielen et al., 1972; Poland et al., 1974).

Diese fehlende Induzierbarkeit wird auf eine Mutation an einem bestimmten Genort, dem sogenannten Ah-locus zurückgeführt, über den die Aktivität der Benzpyrenhydroxylase (AHH) und die Ausprägung anderer, für eine Induktion mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen typischer Eigenschaften reguliert wird (Nebert und Kon, 1973; Haugen et al., 1976). Diese genetische Veränderung bringt keine Beeinträchtigung der Induzierbarkeit durch PB und ähnliche Induktoren mit sich (z.B. Nebert et al., 1971; Gielen et al., 1972; Haugen et al., 1976; Boobis et al., 1977).

Rückkreuzung dieser Mutanten mit normal induzierbaren, sogenannten "responsiven" Mäusen (responsive; C57BL/6N-, B6-Mäuse) ließen einen autosomal dominanten Erbgang des Merkmals der AHH-Induzierbarkeit ("Aryl-hydrocarbon-responsiveness") vermuten (Nebert und Gielen, 1972; Nebert et al., 1972). Neuere Untersuchungen (Robinson et al., 1974) weisen jedoch auf die Beteiligung weiterer Allele am Induktionsprozeß hin.

Vor einiger Zeit haben sich Hinweise dafür ergeben, daß die veränderte Empfindlichkeit gegenüber Cytochrom P-448-Induktoren nicht auf eine Mutation des für die Ausprägung der Benzpyren-Hydroxylase-Aktivität verantwortlichen Strukturgens zurückgeführt werden kann:

Durch Behandlung mit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD), einem bei der industriellen Synthese des Herbizids 2,4,5-Trichlorophenoxyessigsäure ("Agent Orange") entstehenden Nebenprodukt (Poland und Glover, 1973; 1974) kann selbst bei genetisch "nicht-responsiven" D2-Mäusen ein MC-artiger Induktionseffekt erzielt werden (Greig und DeMatteis, 1973; Poland et al., 1974). TCDD ist ein Dibenzodioxin mit sehr hoher Toxizität und starker teratogener und karzinogener Wirkung; seine Wirkung als Induktor der AHH ist bei Ratten 30 000-fach größer als die von MC (Poland und Glover, 1974). Zwar zeigen die nicht-responsiven Mäuse eine geringere Empfindlichkeit gegenüber diesem Induktor (es müssen etwa 10-fach höhere Konzentrationen angewandt werden), aber qualitativ entspricht der Induktionseffekt dem in responsiven Mäusen gefundenen (Poland und Glover, 1975). Poland und Glover stellten daher 1975 die Hypothese auf, daß der Ah-locus die Funktion eines R e g u l a t o r g e n s hat, dessen Hauptgenprodukt ein Rezeptor für Induktoren der AHH darstellt, und nahmen an, daß die Mutation in nicht-responsiven Mäusen mit der Bildung eines Rezeptors mit stark verminderter Affinität für polycyclische Kohlenwasserstoffe einhergeht. 1976 konnten Poland und Mitarbeiter eine makromolekulare Einheit im Lebercytosol von responsiven B6-Mäusen und von Ratten identifizieren, die reversibel mit hoher Affinität radioaktiv markiertes TCDD bindet, während im Cytosol von nicht-responsiven D2-Mäusen nur eine sehr schwache Bindung nachweisbar war. Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe (Poland und Glover, 1973; 1977; Poland

et al., 1976) über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und verschiedener halogenierter aromatischer Kohlenwasserstoffe hinsichtlich ihrer Wirksamkeit als Induktoren der AHH-Aktivität in der Leber einerseits und ihrer Affinität für die cytosolische Bindungseinheit andererseits bekräftigen die Annahme, daß es sich bei dieser Bindungseinheit um den Rezeptor für die Induktion von Cytochrom P-448 (bzw. P_1 -450) und die damit assoziierten Monooxygenasen handelt. 1979 wurde gezeigt, daß die spezifische Aufnahme von TCDD in den Kern der Leberzelle durch Translokation des cytosolischen Rezeptors erfolgt (Greenlee und Poland, 1979; Okey et al., 1979). Es muß angenommen werden, daß dann im Kern auf eine bisher noch nicht geklärte Weise die Induktion durch einen Einfluß des Rezeptors auf den Transcriptionsvorgang ausgelöst wird.

Während über die Vorgänge bei der Induktion von Cytochrome P-448 durch polycyclische Kohlenwasserstoffe bereits Vorstellungen auf molekularer Ebene entwickelt wurden, sind die mit der Induktion durch andere Gruppen von Fremdstoffen einhergehenden Prozesse noch weitgehend unbekannt. Für eine Reihe von Substanzen, bei denen eine induzierende Wirkung gefunden wurde, ist das Induktionsmuster jedoch noch nicht im Detail beschrieben, obwohl diese Gruppe auch einige häufig angewandte Pharmaka einschließt.

Clotrimazol wurde 1969 von Plempel et al. unter der Bezeichnung BAY b 5097 als neues – auch oral wirksames – Antimykotikum mit hoher Aktivität (die Wirkungsaktivität in vitro gegenüber Dermatophyten ist beispielsweise doppelt so groß wie die von Giseofulvin) und einem breiten Wirkungsspektrum sowohl bei verschiedenen Tierspezies als auch beim Menschen vorgestellt.

Die Autoren fanden im Tierversuch nach oraler Applikation bei Hunden eine gewisse Anreicherung von Clotrimazol und seiner Abbauprodukte in der Leber – wobei der Anteil der Metabolite in diesem Organ etwa das Doppelte der Ausgangssubstanz beträgt; zudem treten in der Gallenflüssigkeit in relativ hoher Konzentration ausschließlich Metabolite von Clotrimazol auf. Aus diesen Befunden ließ sich folgern, daß der Abbau des Antimykotikums überwiegend in der Leber stattfindet und die Ausscheidung der mikrobiologisch unwirksamen Metabolite über die Faeces erfolgt.

Clotrimazol ist das erste Imidazolderivat, das systemisch verabreicht werden kann, aber es ist wegen verschiedener Nebeneffekte keineswegs als ideal anzusehen (Holt, 1974). Wie für das schon länger therapeutisch verwendete Antimykotikum Griseofulvin, von dem eine induzierende Wirkung auf Pharmakon abbauende Enzyme in der Leber bekannt ist (Cullen und Catalano, 1967), liegen auch für Clotrimazol eine Reihe von Befunden vor, die als Folge einer Enzyminduktion bei protrahierter Therapiedauer zu werten sind (z.B. Tettenborn, 1970 und 1972; Plempel, 1976). Aus diesem Grunde sind eine Reihe weiterer Imidazolyl-Antimykotika entwickelt worden, von denen man sich ein ebenso breites Wirkungsspektrum gegen pathogene Pilze wie mit Clotrimazol erhofft, bei gleichzeitig verbesserten pharmakologischen und klinischen Eigenschaften (Buchel et al., 1972; Holt, 1974).

Drei solcher neuentwickelter, antimykotisch wirksamer Imidazolderivate sollten daher in der vorliegenden Arbeit neben Clotrimazol auf ihre induktiven Effekte in der Leber hin überprüft werden.

Mettyrapon (2-Methyl-1,2-bis- (3-pyridyl) -1-propanon) wurde zunächst als spezifischer Hemmstoff der mitochondrialen 11 β -Hydroxylase des adrenalen Cortex charakterisiert (Liddle et al., 1958; Chart et al.,

1958; Jenkins et al., 1959), einem Enzymsystem, dessen terminale Oxidase Cytochrom P-450 ist. Wegen seiner inhibitorischen Eigenschaften auf die Steroidbiosynthese wird Metyrapon (MP) in der Klinik diagnostisch zur Testung der Rückkoppelung zwischen Nebennierenrinde und Hypophysenvorderlappen eingesetzt, der beim Gesunden vermehrt ACTH ausschüttet, wenn sich unter MP-Einfluß hormonell unwirksame 11-Desoxy-Vorstufen der Steroide bilden (Liddle et al., 1958; Bissell et al., 1959; Blunk und Bierich, 1968).

Einen inhibitorischen Einfluß übt MP – in vergleichbaren Konzentrationen eingesetzt – auch auf den oxidativen Fremdstoff- und Arzneimittelstoffwechsel aus (Netter et al., 1967; Leibmann, 1969), dessen funktionelles System, die mikrosomalen Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen, Ähnlichkeit mit dem beschriebenen Cytochrom P-450-abhängigen mitochondrialen Enzymsystem in der Nebennierenrinde aufweist (Kuntzman et al., 1964).

Für den Hemmeffekt wurde eine Störung der Anlagerung des aktivierten Sauerstoffs an das Akzeptormolekül verantwortlich gemacht: MP konkurriert mit O_2 um die Sauerstoffbindungsstelle am Hämeisen des Cytochrom P-450 (Netter et al., 1967; 1969). Die spektralen und inhibitorischen Effekte, die MP nach Bindung an Cytochrom P-450 hervorruft, können – wie bereits oben beschrieben – zur Charakterisierung verschiedener Cytochrom P-450-Formen genutzt werden. Es hat sich nämlich gezeigt, daß PB-induzierbare Monooxygenasen durch Zugabe von MP stärker gehemmt wurden als MC-typische, so daß sich eine höhere Affinität von MP für die PB-spezifische Cytochrom P-450 Form annehmen und spektral nachweisen ließ.

Feuer et al. (1971), die den Einfluß einer Reihe potentieller Inhibitoren auf unterschiedliche Gewebe

untersuchten, hatten nach 7-tägiger MP-Behandlung von Ratten für die beiden von ihnen untersuchten Mono-oxygenase-Aktivitäten, Hexobarbital-Oxidase und Coumarin-3-Hydroxylase in Leberhomogenaten eine schwache Steigerung gefunden, ähnlich wie nach PB-Vorbehandlung.

Es erschien wünschenswert, zu klären, ob das Induktionsmuster auch bezüglich weiterer Enzymaktivitäten sowie spektraler und gelelektrophoretischer Parameter dem von PB ähnelt oder ob das durch MP induzierte Cytochrom P-450 andere Eigenschaften aufweist als das PB induzierte.

Das synthetische, hormonell inaktive Pregnenolon-16 α -carbonitril (PCN) wird als Prototyp einer Reihe von Steroiden angesehen, denen eine "katatoxische" Eigenschaft zugesprochen wird. Szabo et al. (1974) stellten fest, daß Tiere, die mit PCN vorbehandelt wurden, gegenüber den toxischen Wirkungen vieler Pharmaka resistent sind. Auch eine Unempfindlichkeit gegenüber Tetrachlorkohlenstoff wurde beschrieben (Tuchweber et al., 1974). Sogar eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber dem Hepatokarzinogen Dimethylnitrosamin nach PCN-Behandlung (Grandjean und Somogyi, 1976) konnte kürzlich aufgrund einer erniedrigten Entstehungsrate von Leberkrebs bewiesen werden (Argus et al., 1978). Nach Kourounakis und Mitarbeitern (1976) ist die katatoxische Wirkung von PCN als eine Begleiterscheinung seiner induktiven Beeinflussung des mikrosomalen Arzneimittelabbaus zu verstehen, d.h. auf beschleunigten Metabolismus der toxischen Substanzen zurückzuführen.

Trotz der potentiellen Bedeutung von PCN als Modulator des Pharmakon-Abbaus in der Leber war zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns bei Ratten die Natur des PCN-induzierten Cytochrom P-450 noch nicht eingehend erforscht.

Steroidhormone sind schon vor längerer Zeit aufgrund einiger indirekter Hinweise neben den traditionellen Induktoren MC und PB als eine dritte Induktorklasse angesehen worden (Lu et al., 1972). So induziert PCN beispielsweise bei Ratten, wenn es in der hinsichtlich der Induktionswirkung effektivsten Dosierung verabreicht wird, die Aktivität der mikrosomalen Äthylmorphin-N-Demethylase in der Leber um das 10-fache, während PB, das diese Enzymaktivität schwächer (höchstens 4-fach) induziert, in erheblich stärkerem Ausmaß die N-Demethylierung eines anderen Pharmakons, Benzphetamin, beschleunigt (Lu et al., 1972). Polycyclische Kohlenwasserstoffe wie MC und BNF üben dagegen ihren größeren induktiven Einfluß auf die Benzpyrenhydroxylase-(AHH)-Aktivität aus. Haugen et al. (1976) konnten die vermutete Existenz dreier Induktorklassen bei einer anderen Tierart bestätigen: Besonders der gelelektrophoretische Nachweis dreier verschiedener induktorspezifischer Hämoproteinbanden, von denen jeweils eine nach Vorbehandlung von Mäusen mit BNF, PB oder PCN präferentiell ansteigt, war für diese Zuordnung ausschlaggebend. Es erhob sich die Frage, ob das von Lu und Mitarbeitern (1972) bei Ratten gefundene PCN-spezifische Enzyminduktionsprofil auf gelelektrophoretischer Ebene von ähnlich distinkten Veränderungen im Mikrosomen-Trennmuster wie bei Mäusen (Haugen et al., 1976) begleitet ist. Hierüber lagen zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen noch keine Angaben vor.

Rifampicin, ein aus *Streptomyces mediterranei* isoliertes (Fürész et al., 1967) und von Maggi et al. (1966) erstmals synthetisiertes, oral wirksames Antibiotikum aus der Gruppe der Rifamycine, die bei Bakterien – nicht aber bei Eukaryonten – durch Blockierung der bakteriellen RNA-Polymerase die Transcription hemmen, wird in der Humanmedizin insbesondere zur Behandlung von Tuberkulosen angewandt. Rifampicin greift in das Stoffwechselgeschehen der Leber ein und kann die Me-

tabolisierung anderer Arzneimittel entscheidend beeinflussen (vergl. Bolt, 1975). Derartige Interferenzen wurden erstmalig bei der Antikoagulantientherapie festgestellt (Michot et al., 1970): Bei Patienten, die gleichzeitig mit Rifampicin behandelt wurden, mußte zur Erhaltung der gewünschten gerinnungshemmenden Wirkung die Antikoagulantien-Dosis erhöht werden. Peters et al. (1974) berichteten über eine ebenfalls auf gesteigerten Abbau zurückzuführende fast auf das Doppelte erhöhte Digitoxin-Elimination bei Rifampicin-behandelten Patienten. Einen ähnlichen Effekt konnten Syvählahti et al. (1974) auf die Plasmahalbwertszeit von Tolbutamid beobachten; ebenso wurde auch über einen gesteigerten oxidativen Abbau von Cortisol in Rifampicin-behandelten Tuberkulose-Patienten berichtet (Edwards et al., 1974). 1975 fanden Zilly et al. nach 8-tägiger Rifampicin-Gabe beim gesunden Menschen und ebenso 1977 bei Patienten mit Leberschäden eine erhöhte Clearance für Hexobarbital und Tolbutamid, zwei Pharmaka, die vollständig über mikrosomale Leberenzyme abgebaut werden (Hexobarbital: Bush und Weller, 1972; Tolbutamid: Thomas und Ikeda, 1966). Rifampicin ist aber auch nicht zuletzt deswegen von besonderem Interesse, weil eine Steigerung des Östrogenstoffwechsels unter Rifampicinbehandlung beim Menschen zu Wechselwirkungen mit hormonalen Kontrazeptiva geführt hat (Nocke-Finck et al., 1973; Bolt et al., 1974), indem es bei Tuberkulose-Patientinnen vermehrt zum Auftreten unerwarteter Schwangerschaften kam. Die Ursache für die genannten Interferenzen des Antibiotikums mit anderen Arzneimitteln ist in der Induktion mikrosomaler Pharmaka-abbauender Monooxygenasen zu sehen, die schon unter therapeutischen Dosen auftritt (Remmer et al., 1973). Wie die genannten Autoren nachweisen konnten, war in Leberhomogenaten, die aus Leberbiopsien Rifampicin-behandelter Patienten gewonnen wurde, der Gehalt an oxidativen Abbauwegen beteiligter Enzyme (z.B. der p-Nitroanisol-Demethylase) um das 2 - 4-fache gesteigert. Bolt und Mitarbeiter (1974;

1975) konnten bei in vitro-Untersuchungen mit menschlichen Lebermikrosomen nach 6-tägiger Rifampicin-Gabe eine in der gleichen Größenordnung (Faktor 4) liegende Zunahme der aromatischen Ringhydroxylierung des natürlichen Östrogens Östradiol und von Äthinylöstradiol, einem in oralen Kontrazeptiva häufig verwendeten Östrogen, messen und stellten einen Anstieg des Cytochrom P-450-Gehaltes fest.

Für verschiedene Tierspezies , so für das Meerschweinchen (Roots et al., 1976) und die Maus (Pessayre und Mazel, 1976), ist eine induzierende Wirkung von Rifampicin ebenfalls nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten bei Ratten keine Anzeichen für eine Induktion beobachtet werden (Pessayre und Mazel , 1976).

Äthanol, dessen oxidativer Abbau fast ausschließlich in der Leber stattfindet, steigert bei chronischer Einnahme seinen eigenen Metabolismus. Die Mechanismen dieser metabolischen Anpassung sind noch nicht vollständig geklärt: Einige Arbeitsgruppen (z.B. McClearn et al., 1964; Hawkins et al., 1965; Dippel und Ferguson, 1977) konnten nach chronischer Äthanol-Behandlung eine induktiv gesteigerte Aktivität der im Cytosol der Leberzelle lokalisierten Alkohol-Dehydrogenase (ADH) nachweisen, andere Autoren führen den Steigerungseffekt überwiegend auf die Induktion membrangebundener Monooxygenasen des endoplasmatischen Retikulums zurück (Lieber et al., 1975), die an der Oxidation des Alkohols zum Acetaldehyd beteiligt sind (Lieber und DeCarli, 1970; 1972; Lieber et al., 1975). Die Auswirkungen chronischer Äthanolbelastung manifestieren sich in einer Reihe adaptativer Veränderungen der Leber, die neben der häufig festzustellenden makroskopischen Vergrößerung des Organs und Einlagerung von Triglyceriden in Zellen u.a. auch eine elektronenmikroskopisch sichtbare Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (Iseri et al., 1966; Rubin et al., 1968)

umfassen – vergleichbar mit den Effekten, die bekannte andere Enzyminduktoren wie PB oder MC an diesen Membranstrukturen hervorrufen (z.B. Remmer et al., 1963). Neben dem gesteigerten oxidativen Abbau von Äthanol in Mikrosomen (z.B. Lieber und DeCarli, 1970) werden als Folge der chronischen Äthanolbelastung auch erhöhte Aktivitäten des Arzneimittelstoffwechsels gemessen (z.B. Lieber et al., 1975; Kalant et al., 1976; Luoma und Vorne, 1976).

Für den Menschen stellten Kater et al. (1969) bei Blutspiegelmessungen erhöhte Clearance-Werte für bestimmte Pharmaka bei Alkoholikern fest, und Rubin et al. (1968) fanden bei in vitro-Untersuchungen als Folge einer Äthanolbehandlung neben einer Zunahme der Äthanol-Oxidation erhöhte Metabolisierungsraten der mikrosomalen Monooxygenasen für die als Substrate angebotenen Pharmaka. Gesteigerten Abbau von Äthanol, Meprobamat und Pentobarbital konnten auch Misra et al. (1971) nach chronischer Äthanolaufnahme bei Ratten und bei Menschen beobachten. Kalant et al. (1976) fanden nach 7-tägiger Äthanolbehandlung von Ratten einen signifikanten Anstieg der in vitro-Metabolisierungsraten von Aminopyrin, Anilin und Meprobamat. Die Zunahme der Enzymaktivitäten waren in allen drei Fällen vergleichbar mit denen nach chronischer PB-Gabe. Auch der Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber der Äthanolbehandelten Tiere lag nur wenig unter dem nach PB-Induktion gemessenen.

Villeneuve et al. (1976) führten eine Teilreinigung des hepatischen Cytochrom P-450 nach chronischer Äthanolbehandlung durch und stellten fest, daß diese Präparation bevorzugt Anilin metabolisierte.

In ungereinigten mikrosomalen Systemen konnten Ullrich et al. 1975 bei Einsatz verschiedener Enzyminhibitoren auffällige Unterschiede feststellen : Metyrapon als bekannter Hemmstoff PB-induzierbarer Monooxygenase-

Aktivitäten bewirkte in Mikrosomen Äthanolbehandelter männlicher Ratten eine im Vergleich zu PB-Mikrosomen nur schwache Hemmung der Äthoxycoumarin-O-Deäthylierung und blieb in Präparationen von weiblichen Äthanolbehandelten Ratten völlig ohne Einfluß auf die Enzymaktivität. Eine sehr effektive Hemmung konnte dagegen mit Tetrahydrofuran – unabhängig vom Geschlecht der Tiere – in den Äthanol-Gruppen festgestellt werden. Der genannte Inhibitor zeigte in vergleichbaren Konzentrationen in PB-Mikrosomen keine Hemmung der O-Desalkylierungsreaktion. Diese Befunde zur Substratspezifität des teilgereinigten Cytochroms und zur differentiellen Hemmung in Mikrosomen lassen vermuten, daß es sich bei dem durch Äthanol induzierten Cytochrom P-450 um eine spezifische – von der PB-induzierbaren Form verschiedene – Cytochrom P-450-Spezies handelt.

Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit geht von der Tatsache aus, daß das früher als homogen angesehene Cytochrom P-450 heute als ein System von Monooxygenasen, die unterschiedlich induzierbar sind, betrachtet wird (Guengerich, 1977; Ullrich und Kremers, 1977).

Ziel der Arbeit ist erstens der Nachweis, daß Substanzen aus der Induktorklasse der polycyclischen Kohlenwasserstoffe nicht ein einheitliches Cytochrom P-450 induzieren, sondern mehrere verschiedene Formen des Hämoproteins. Zweitens soll der Verlauf der Induzierbarkeit dieser Enzymformen sowie der Konzentrationsverlauf des für Bindung und Translokation der Induktoren verantwortlichen cytosolischen Rezeptors während der Ontogenese herausgearbeitet werden. Drittens wird versucht, für einer Reihe von in der Literatur noch nicht oder noch nicht vollständig charakterisierten Induktoren den Induktionstyp festzustellen.

1. Der Nachweis verschiedener durch polycyclische Kohlenwasserstoffe induzierbarer Cytochrome P-450 bei der Ratte wird zunächst an erwachsenen Tieren, bei denen eine abgestufte Antwort auf den Induktor 3-Methylcholanthren hervorgerufen wird, durchgeführt. Dazu werden zwei Versuchsanordnungen gewählt:

- Untersuchung des Zeitverlaufs der Induktion nach einer Dreifachdosis des Induktors unter Verzögerung des Induktionsverlaufes durch Hemmung der Proteinsynthese.
- Untersuchung des Zeitverlaufs der Induktion nach einer Einzeldosis des Induktors.

Zur Analyse der Lebermikrosomen werden folgende Methoden eingesetzt:

- a) Untersuchung einer enzymatischen Testreaktion (Biphenyl-2-Hydroxylierung)
- b) Untersuchung zweier spektraler Parameter (Blauverschiebung des CO-Spektrums und Affinitätsverlust für Metyrapon)

c) gelelektrophoretische Auftrennung der mikrosomalen Proteine .

Durch Korrelation der enzymatischen und spektralen Daten mit den Ergebnissen der gelelektrophoretischen Analyse wird geprüft, ob eine Zuordnung der einzelnen induzierbaren Funktionen des Enzymsystems zu bestimmten Polypeptidbanden möglich ist.

Zum Vergleich wird ein Induktor aus einer anderen Substanzklasse, Phenobarbital, in die Studie miteinbezogen. Außerdem werden Mischinduktionsexperimente mit 3-Methylcholanthren und Phenobarbital durchgeführt, um die Korrelationen funktioneller und gelelektrophoretischer Veränderungen auch unter diesen Umständen zu prüfen.

2. Ein weiterer Weg zur Charakterisierung verschiedener durch polycyclische Kohlenwasserstoffe induzierbarer Cytochrom P-450-Formen bietet sich in der ontogenetischen Analyse der Induktion an. Hier wird auch die Ontogenese des sog. TCDD-Rezeptors, dem eine Initialfunktion bei der Induktion zugeschrieben wird, mit untersucht. Da Speziesunterschiede im Fremdstoffmetabolismus eine Rolle spielen (Kato, 1979), werden in diese Studie außer der Ratte drei weitere Nagerspezies einbezogen: Die hinsichtlich der genetischen Regulation der Induktion mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen gut untersuchte Maus (Nebert et al., 1975), das Kaninchen und die Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*).

Zur Analyse der zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen Fetalperiode und Erwachsenenalter nach Behandlung mit dem polycyclischen Kohlenwasserstoff β -Naphthoflavon gewonnenen Lebern werden folgende Methoden eingesetzt:

a) Untersuchung zweier enzymatischer mikrosomaler Testreaktionen (Arylhydrocarbonhydroxylierung und Acetanilid-4-Hydroxylierung)

b) Untersuchung des CO-Spektums in reduzierten Mikrosomen

c) gelelektrophoretische Auftrennung der mikrosomalen Proteine

d) Bestimmung der spezifischen Bindung von tritiummarkiertem TCDD im Cytosol.

Es wird geprüft, ob die Entwicklung der genannten Parameter in der Perinatalperiode synchron verläuft oder ob sich durch unterschiedliche Entwicklungsverläufe Hinweise auf mehrere verschiedene durch den gleichen Induktor induzierte Enzymformen ergeben. Außerdem wird erstmalig der Nachweis des cytosolischen Rezeptors bei fetalen und neugeborenen Tieren versucht.

3. Für eine Reihe von klinisch wichtigen Arzneimitteln bzw. experimentell vielverwendeten Induktoren fehlen bisher detaillierte Beschreibungen des Induktionsmusters in Lebermikrosomen. Zur Analyse dieses Musters bei der Ratte werden folgende Methoden eingesetzt:

- a) Untersuchung von Monooxygenaseaktivitäten
 - α) präferentiell durch polycyclische Kohlenwasserstoffe induzierbare: Arylhydrocarbonhydroxylase, Biphenyl-2-Hydroxylase, 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase, Anilinhydroxylase)
 - β) präferentiell durch Phenobarbital induzierbare: Äthylmorphin-N-Demethylase
- b) Untersuchung der Epoxydhydratase-Aktivität
- c) Untersuchung zweier spektraler Parameter (CO-Spektrum und Affinität für Metyrapon)
- d) gelelektrophoretische Auftrennung der mikrosomalen Proteine

Für das Antimykotikum Clotrimazol gibt es bisher nur Hinweise auf einen Induktionseffekt; über den Ligandentyp ist nichts bekannt. Drei Clotrimazol-Analoga werden erstmalig auf ihre Induktionswirkung hin untersucht. Metyrapon, als präferentieller Ligand des phenobarbital-induzierbaren Cytochroms P-450 von großem experimentellen Interesse, ist ebenfalls zwar als Induktor erkannt, auf seinen Induktionstyp jedoch noch nicht untersucht worden.

Pregnenolon-16 α -carbonitril (PCN) wird für die Maus einer eigenen Induktorklasse zugerechnet. Eine eingehende Analyse dieses Induktors an der Ratte ist jedoch noch nicht vorgenommen worden.

Rifampicin gilt für die Maus und für den Menschen als potenter Induktor, an der Ratte wurden jedoch keine Induktionseffekte gefunden. Es wird geprüft, ob sich mit dem oben dargestellten analytischen Raster trotz fehlender Zunahme des Gesamtgehaltes von Cytochrom P-450 eine Verschiebung der Cytochrom P-450-Population nachweisen läßt.

Für Äthanol ist ebenfalls die Zugehörigkeit zu einer eigenen Induktorklasse behauptet worden. Eine Überprüfung dieser Annahme wird durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Als Induktoren verwendete Substanzen:

3-Methylcholanthren (MC) wurde von Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y., USA bezogen;

Phenobarbital (Na-Salz) war ein Produkt der Fa. Merck, Darmstadt;

Clotrimazol und die neuentwickelten Antimykotika BAY f 8751, 2-(2,4-Dichlorophenoxy)-1-(1H-Imidazol-1-yl)-4,4-Dimethyl-3-Pentanon; BAY g 7155, β -(2,4-Dichlorophenoxy)- α -(1,1-Dimethyläthyl)-1H-Imidazol-1-Propanol und BAY l 9139, β -(4-Chlorophenoxy)- α -(1,1-Dimethyläthyl)-1H-Imidazol-1-Äthanol wurden von der Fa. Bayer, Leverkusen zur Verfügung gestellt; Metyrapon (MP), das auch als Ligand für reduzierte Mikrosomen eingesetzt wurde, war ein Geschenk von Dr. J.J. Chart, CIBA Pharmaceutical Co., Summit, N.J., USA;

Pregnenolon-16 α -Carbonitril (PCN) wurde uns freundlicherweise von Dr. R.L. Bergstrom, G.D. Searle and Company, Chicago, Ill., USA überlassen;

Rifampicin und der Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid (CH) stammten von der Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg;

β -Naphthoflavin (BNF) wurde von Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin, USA bezogen;

Erdnußöl lieferte die Apotheke der Universitätskliniken, Mainz, Mazola-Maisöl die Fa. Best Foods, Englewood Cliffs, N.J., USA.

Enzyme und Cofaktoren waren Produkte der Fa. Boehringer, Mannheim.

Substrate für die Bestimmung der Monooxygenase-Aktivitäten:

Acetanilid und 4-Hydroxyacetanilid wurden von Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA bezogen und aus Äthanol und Wasser rekristallisiert (HPLC-Prüfung erbrachte 99,9 %ige Reinheit der Substanzen);

7-Äthoxycoumarin wurde nach der Methode von Ullrich und Weber (1972) aus 7-Hydroxycoumarin (Umbelliferon), einem Produkt der EGA-Chemie KG, Steinheim, synthetisiert;

Äthylmorphin lieferte die Fa. Merck, Darmstadt;

Benzpyren (BP) wurde von Aldrich-Europe, Janssen GmbH, Düsseldorf bezogen;

Biphenyl (zweimal aus Äthanol rekristallisiert) stammte von BDH-Chemicals, Poole, Dorset, GB, und die Hydroxylierungsprodukte 2-Hydroxy- und 4-Hydroxybiphenyl (ebenfalls zweimal rekristallisiert) waren Geschenke der Fa. Hopkins and Williams Ltd., GB.

Substanzen für die Gelelektrophorese:

Außer SDS (Natriumdodecylsulfat) und Glycerin (Fa. Merck, Darmstadt) wurden alle Substanzen von der Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg bezogen (Acrylamid, reinst, zweimal kristallisiert; Ammoniumpersulfat; Bromphenolblau; Coomassie Brilliant Blue R-250; N,N'-Methylenbisacrylamid und TEMED).

Für die in den USA durchgeführten gelelektrophoretischen Experimente fanden entsprechende Substanzen von Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal., USA Verwendung.

Substanzen für die Rezeptoranalyse:

Saccharose für die Dichtegradientenzentrifugation lieferte die Fa. Schwartz-Mann, Orangeburg, N.Y., USA, Aktivkohle (Norit A) die Fa. Fisher Scientific Co., Pittsburg, PA, USA und Dextran die Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA;

HEPES (4-(2-Hydroxyäthyl)-1-Piperazin-Äthansulfonsäure) war ein Produkt der Calbiochem, La Jolla, Cal., USA und unmarkiertes TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) wurde von Dow Chemical Company, MI, USA bezogen.

Rinderserumalbumin stammte von den Behringwerken, Marburg/Lahn.

Als Szintillatorflüssigkeit diente Aquasol (New England Nuclear, Boston, Mass., USA).

Die benutzten Gase lieferte die Fa. Linde, Mainz.

Alle anderen Reagenzien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden von der Fa. Merck, Darmstadt geliefert.

Radioaktiv markierte Substanzen:

[¹⁴C]-Acetanilid (11 mCi/mmol) wurde von California Bionuclear Corporation, Sun Valley, Cal., USA bezogen, und [³H]-markiertes 4-Hydroxyacetanilid (400 mCi/mmol) von New England Nuclear, Boston, Mass., USA.

[¹⁴C]-Styroloxid (Substrat für die Epoxidhydratase) war ein Geschenk Prof. Dr. F. Oesch, Pharmakologisches Institut der Universität Mainz.

[³H]-TCDD (2,3,7,8-[1,6-³H]-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) (58 mCi/mmol) wurde von ICN Chemical and Radioisotope Division, Irving, Cal., USA synthetisiert.

2.2. Versuchstiere und Tierhaltung

Für alle am Pharmakologischen Institut in Mainz durchgeführten Experimente wurden 150 g schwere männliche Sprague Dawley-Ratten der Versuchstieranstalt WIGA, Sulzfeld/Allgäu verwendet. Die Tiere wurden in institutseigenen Tierställen konventionell gehalten und vor Behandlungsbeginn mindestens 3 Tage an die neue Umgebung adaptiert. Altromin®-Trockenfutter (Standarddiät der Fa. Altromin, Lage, Lippe) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung; 12 h vor Tötung der Tiere wurde das Futter entfernt.

Die Versuchstiere für die in den USA durchgeführten Rezeptor-Ontogenitäts-Studie lieferte mit Ausnahme der Kaninchen (New Zealand White Rabbits, die von Dutchland Laboratories, Denver, Penn. bezogen wurden), der Veterinary Resources Branch, National Institutes of Health (Bethesda, Maryland): Die drei neben den Kaninchen verwendeten Spezies waren Sprague Dawley-Ratte, C57 BL/6 N-Maus (Reinzucht-Stamm) und *Sigmodon hispidus* (Syn. *Sigmodon hispidus*). Letztere auch als Baumwollratte ("Cotton Rat") bezeichnete Spezies, die zu den Cricetidae zählt, unterscheidet sich von der Labormaus, *Rattus norvegicus*, sowohl im äußeren Erscheinungsbild als auch in der Anzahl der Chromosomen, der Länge der Tragzeit etc. - Abgesehen von den noch nicht geschlechtsreifen Tieren (drei Wochen und jünger) waren alle Mäuse weiblich, Ratten, Kaninchen und *S. hispidus* dagegen männlich, sofern nicht anders vermerkt. Die Tragzeiten bei Ratte und Maus betragen ca. 21 Tage, beim Kaninchen 30 Tage und bei *S. hispidus* etwa 27 Tage. Die Tiere wurden unter streng kontrollierten Bedingungen bei künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus (14/10 h) gehalten und hatten Wasser und Futter (Purina NIH Open Formula Rat and Mouse Ration, Purina Laboratory Chow oder NIH 09 Rabbit Portion) zur freien

Verfügung. Alle Jungtiere bis zum Alter von 3 Wochen wurden zusammen mit den Muttertieren geliefert.

2.3. Vorbehandlung der Tiere

2.3.1. Zeitverlaufsstudie unter MC + CH

Für die Zeitverlaufsstudie der 3-Methylcholanthren-Induktion (MC) unter gleichzeitiger Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid (CH) wurde den Ratten MC in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht - gelöst in 5 ml Erdnußöl/kg KG dreimal im Abstand von 12 h intraperitoneal verabreicht; CH wurde jeweils 3 h vor den MC-Injektionen in einer Dosis von 1 mg/kg KG gelöst in 5 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung/kg KG ebenfalls intraperitoneal injiziert. Die so vorbehandelten Versuchstiergruppen wurden entweder unmittelbar im Anschluß an die letzte MC-Injektion oder nach 12, 24 bzw. 36 h durch Überstreckung der Halswirbelsäule getötet. Kontrollgruppen wurden mit reinem Erdnußöl behandelt. Eine (vollinduzierte) MC-Vergleichsgruppe erhielt nur den Induktor ohne Proteinsynthesehemmstoff. Die Tötung der MC-behandelten Tiere und einer Kontrollgruppe wurde 36 h nach der letzten Injektion vorgenommen, eine weitere Öl-behandelte Gruppe wurde unmittelbar nach der letzten Injektion getötet (Öl: 0 h).

2.3.2. Zeitverlaufsstudie unter MC, PB und MC + PB

In einer weiteren Untersuchungsreihe von Zeitverläufen der Induktion mit MC, PB (Phenobarbital) und einer Mischinduktion durch simultane Gabe beider Substanzen wurden die Induktoren als Einzeldosis intraperitoneal

verabreicht (MC gelöst in Erdnußöl: 1 x 30 mg/kg KG, PB gelöst in NaCl: 80 mg/kg KG bzw. bei Mischinjektion 80 mg PB/kg 3 h vor Gabe von 30 mg MC/kg). 12, 24 bzw. 36 h nach Injektion der entsprechenden Substanzen wurden die Tiere getötet. Als Kontrollen dienten mit Erdnußöl bzw. mit Kochsalzlösung behandelte Tiergruppen (5 ml/kg KG bzw. 3,3 ml/kg KG).

2.3.3. Clotrimazol und -Analoga

Die zur Untersuchung eines evtl. induktiven Einflusses verschiedener Antimykotika (Clotrimazol, BAY f 8751, BAY g 7155 und BAY l 9139) auf mikrosomale Parameter durchgeführten Behandlungen wurden auf oralem Wege vorgenommen. Die Substanzen wurden in einer 1 %igen Gummi arabicum-Suspension (10 mg Ga/1 ml Leitungswasser) gelöst bzw. die schlecht löslichen neuen Antimykotika durch 60-minütiges heftiges Schütteln feinst suspendiert (Konzentration der Lösungen: 20 mg/ml) und den Tieren in Dosierungen von 50 und 100 mg/kg KG dreimal im Abstand von 24 h per Schlundsonde appliziert. Clotrimazol wurde außerdem in einer geringeren Dosierung (3 x 25 mg/kg KG) getestet. Als Vergleichssubstanz für die Beurteilung der Induktionswirkung diente PB, verabreicht als dreimalige intraperitoneale Dosis von 80 mg/kg KG (in 5 ml NaCl/kg KG). Kontrolltiere erhielten vergleichbare Volumina Gummi arabicum-Suspension (p.o.) bzw. NaCl (i.p.).

2.3.4. Metyrapon

Die Behandlung mit Metyrapon (MP) erfolgte intraperitoneal, dreimal in 24 h-Intervallen in zwei verschiedenen Dosierungen: 50 und 100 mg MP/kg KG, gelöst in 2,5 bzw. 5 ml/kg KG NaCl-Lösung. Die Kontrollgruppe erhielt entsprechend 0,9 %ige Kochsalzlösung.

2.3.5. Pregnenolon-16 α -Carbonitril

Pregnenolon-16 α -Carbonitril (PCN) wurde als Suspension in Gummi arabicum-Zubereitung (15 mg PCN/ml Ga-Suspension) ebenfalls dreimal in einer Konzentration von 100 mg/kg KG peroral verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde mit Ga-Suspension (per os) behandelt.

2.3.6. Rifampicin

Rifampicin mußte wegen der hohen Metabolisierungsrate bei der Ratte zweimal täglich in einer Dosis von 50 mg/kg KG intraperitoneal injiziert werden; die Behandlungsdauer betrug 3 bzw. 6 Tage. Das Pharmakon war in 6 mM HCl in einer Konzentration von 15 mg/ml gelöst (pH $\sim$ 3); Kontrolltiere erhielten das reine Lösungsmittel.

2.3.7. Äthanol

Zur Untersuchung von Äthanol als Induktor wurde den Tieren 14 Tage lang 15 % Äthanol im Trinkwasser ad libitum angeboten. Unter gleichen Bedingungen gehaltene Kontrollratten blieben unbehandelt (normales Trinkwasser).

Jede der unter 2.3. beschriebenen Versuchsgruppen setzte sich aus 3 - 4 Ratten zusammen, deren Lebern für die Herstellung von Mikrosomen kombiniert und gemeinsam aufgearbeitet wurden.

2.3.8. Rezeptorstudie

Zur Vorbehandlung der Versuchstiere der in den USA durchgeführten Rezeptor-Ontogenie-Studie wurde β -Naphthoflavon (BNF) - gelöst in Mazola-Maisöl (Konz. der Lösung: 8 mg/ml) - 36 h vor dem Töten der Tiere intraperitoneal in einer Dosis von 200 mg/kg KG appliziert; Kontrolltiere erhielten gleiche Volumina an Öl. Die Induktion der Foeten erfolgte transplacentar durch intraperitoneale Behandlung der Muttertiere mit ihrem Körpergewicht entsprechenden Mengen an Induktor bzw. Lösungsmittel. Jede Versuchsgruppe bestand aus - alters- und größenabhängig - unterschiedlichen Anzahlen (s. Legende der Abb. 8 - 11) von jeweils gleichaltrigen Tieren einer Spezies, deren Lebern zur Präparation der Mikrosomen- und Cytosolfraktion kombiniert wurden.

2.4. Präparation der Mikrosomen- und Cytosolfraktion

Unmittelbar nach dem Dekapitieren und Ausbluten der Tiere wurde die Leber in situ über die Pfortader mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung perfundiert (um Erythrozyten weitgehend auszuwaschen), danach entnommen, mit dem Doppelten ihres Gewichts an Saccharose-Versen-Tris(SVT)-Lösung nach Leybold und Staudinger (1959) versetzt (0,25 M Saccharose, 0,005 M Versen = Na-EDTA, 0,02 M Trishydroxymethylaminomethan mit HCl eingestellt auf pH 7,4) und mittels Schere zerkleinert. Nach Homogenisierung im Potter-Elvehjem-Homogenisator unter Eiskühlung wurde das Leberhomogenat zur Entfernung von Zelltrümmern, Kernen und Mitochondrien in einer Sorvall-Zentrifuge 15 min bei 1 600 x g und weitere 30 min bei 9 000 x g zentrifu-

giert. Der Überstand wurde 60 min in einer Beckman Ultrazentrifuge bei 105 000 x g (Festwinkelrotor Typ 60 Ti) zentrifugiert, die sedimentierenden Mikrosomen zum Auswaschen von Hämoglobin erneut in frischer SVT-Lösung homogen aufgenommen und nochmals einem Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen unterworfen.

Die gewaschenen Mikrosomen wurden dann in N₂-begaster SVT-Lösung resuspendiert, auf eine Proteinkonzentration von 15 - 25 mg/ml verdünnt, homogenisiert und als Proben von 0,5 - 1,0 ml Volumen eingefroren, wo sie bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C gelagert wurden.

Alle genannten Präparationsschritte wurden bei 0° C bzw. 4° C durchgeführt.

Die in den USA durchgeführten Mikrosomen- und Cytosol-Präparationen wurden wie folgt modifiziert: Da bei den jungen Tieren der kleineren Arten und besonders bei den Foeten eine Perfusion der Leber nicht möglich war, wurde - um vergleichbare Bedingungen zu schaffen - auch bei den größeren Tieren - mit Ausnahme der älteren Kaninchen - auf eine Perfusion der Leber verzichtet. Stattdessen wurde versucht, durch mehrfaches Waschen der mit der Schere zerkleinerten Leberstückchen in phosphatgepufferter 0,85 %iger NaCl-Lösung eine möglichst weitgehende Entfernung von Hämoglobin zu erreichen. Die anschließende Homogenisierung der Leberproben wurde in einem Ultra Turrax-Homogenisator im Eisbad unter Einhaltung von Pausenintervallen vorgenommen. Als Homogenisationsmedium diente HEDG-Puffer (25 mM HEPES, 1,5 mM EDTA - Äthylen-diamintetraessigsäure, 1 mM Dithiothreitol = DTT, 10 % v/v Glycerin, pH 7,6), der auch für die weiteren Schritte zur Präparation des cytosolischen Rezeptors verwendet wurde. Die nach der Ultrazentrifugation

sedimentierten Mikrosomen wurden in 0,25 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,6), der 30 % v/v Glycerin enthielt, resuspendiert, auf eine Proteinkonzentration von 10 - 20 mg/ml gebracht (bei foetalen Lebermikrosomen betrug der Proteingehalt 5 - 10 mg/ml), homogenisiert und in kleinen Portionen bei -80°C eingefroren.

Der Überstand des ersten Ultrazentrifugationsschrittes stellt die Cytosolfraktion dar und wurde für die Rezeptorstudien verwendet. In den meisten Fällen wurden die Cytosolfractionen innerhalb einer Stunde nach ihrer Isolierung weiterverarbeitet. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, daß auch Lagerung bei -80°C für 4 Wochen (oder mehr), weder in den cytosolischen Proben eine Abnahme der meßbaren Rezeptorkonzentration noch in den mikrosomalen Proben einen Verlust der Enzymaktivität oder des Cytochrom P-450-Gehaltes verursacht.

2.5. Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde nach Lowry et al. (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard durchgeführt.

2.6. Spektralanalytische Messungen

2.6.1. Bestimmung von Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5

Der mikrosomale Cytochrom P-450-Gesamtgehalt wurde mit der üblichen Methode nach Omura und Sato (1964) bestimmt. Dabei wurde für die Absorptionsdifferenz zwischen dem Soret-Maximum um 450 nm und der Basislinie bei 490 nm ein Extinktionskoeffizient (ϵ) von $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angenommen.

In Mikrosomenproben von Foeten und neonaten Tieren wurde - um das Maximum des CO-Komplexes in Gegenwart relativ großer Mengen von Hämoglobin genauer zu bestimmen - Cytochrom P-450 im allgemeinen zusätzlich durch eine von Schoene et al. (1972) beschriebene spektralphotometrische Methode, bei der die Differenz zwischen unreduzierten CO-begasteten Mikrosomen und dem Spektrum, das sich nach anschließender Reduktion mit Natrium-Dithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) darstellt, zur Berechnung herangezogen wird, bestimmt.

Die am NIH durchgeführten Wellenlängenmessungen wurden, zum Zweck größerer Genauigkeit bei der Festlegung der Peakmaxima, standardisiert durch Eichung des Spektrophotometers mittels eines Holmiumoxid-Kristalls (Fisher Scientific Company, Silver Spring, Maryland, USA). Mit dem zur Verfügung stehenden Gerät in Kombination mit einem Zusatzgerät zum optischen Abgleich (Beam Scrambler) war es so möglich, Wellenlängendifferenzen von 0,1 nm sicher zu unterscheiden, was zum Erkennen von z.T. geringfügigen Blauverschiebungen der Absorptionsmaxima im Soret-Bereich nach Induktion wichtig war (Die im Ergebnisteil angegebenen Daten sind jedoch jeweils auf 0,5 nm gerundet).

Die routinemäßige Bestimmung des Gehalts an Cytochrom b_5 in den Mikrosomen wurde nach der Methode von Raw und Mahler (1959) durchgeführt.

2.6.2. Bestimmung der Lage des Absorptionsmaximums des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes mittels Sekantentechnik

Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von Omura und Sato (1964), wobei jedoch die eingesetzte mikrosomale Proteinmenge so variiert wurde, daß die Cytochrom P-450-Gehalte der verschiedenen Proben in den einzelnen Testansätzen einander angeglichen wurden und sich so für die Absorptionsmaxima im Soret-Bereich gleiche Höhen ergaben. Um den willkürlich als Eichpunkt gewählten Schnittpunkt der Wellenlänge 448 nm mit dem Soret-Peak wurden 4 Sekanten so durch den oberen Bereich der Absorptionskurve gelegt, daß die Eichpunkte 449 und 447, 450 und 446, 451 und 445 sowie 452 und 444 nm miteinander verbunden wurden. Der Winkel α dieser Sekanten gegenüber der Horizontalen wurde jeweils gemittelt, auf den ebenso erhaltenen Mittelwert dieses Winkels bei Ölkontrollen bezogen und als $\Delta\alpha$ angegeben (vergl. Gerlach, 1977).

2.6.3. Ermittlung der apparenten Bindungskonstanten K_S für Metyrapon in reduzierten Mikrosomen

Die apparente Bindungskonstante K_S für Metyrapon (MP) wurde nach einer von Jonen et al. (1974) beschriebenen Methode durch kumulative Zugabe kleiner Volumina definierter MP-Lösungen (Konzentrationen: 1, 10 und 100 mM MP in glycerinhaltigem Kalium-Phosphat-Puffer) zu reduzierten Mikrosomen (1 mg Protein/ml Kalium-Phosphatpuffer mit 30 % Glycerin, pH 7,8, reduziert

durch 1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /mg Protein) bestimmt. Die in der Meßküvette durch MP-Zugabe bewirkte Zunahme des Ausgangsvolumens von 2,5 ml (und die damit verbundene Abnahme der mikrosomalen Proteinkonzentration) wurde in der Referenzküvette durch Zugabe gleicher Mengen an Puffer ausgeglichen, wobei der Verdünnungseffekt ca. 10 % ausmachte und vernachlässigt wurde. In ca. 8 Titrationsschritten wurde die MP-Konzentration in der Proben-Küvette kontinuierlich erhöht, dabei stieg die Konzentration des Liganden während der Titration von MC-Mikrosomen von 0,025 auf 5,0 mM an; bei PB-Mikrosomen, die eine erheblich stärkere Bindung von MP zeigen, lag der gewählte Konzentrationsbereich um etwa eine Größenordnung darunter. Die Untersuchungen erfolgten bei einer Inkubationstemperatur von 30° C. Zwischen Zugabe der MP-Lösung und Aufzeichnung des Differenzspektrums wurde jeweils ein Zeitintervall von 3 min eingehalten. Die Auswertung erfolgte nach Ermittlung der Absorptionsdifferenz zwischen Basislinie und dem Differenzspektrum am Absorptionsmaximum (443 - 446 nm) gegenüber 490 nm zunächst graphisch durch Auftragen der reziproken Werte von MP-Konzentrationen und zugehörigen Absorptionsmaxima in Lineweaver-Burk-Diagrammen. Auf diese Weise wurden die für die rechnerische Auswertung geeigneten Konzentrationsbereiche festgelegt, in denen lineare Abhängigkeit bestand (es wurden nur Werte bis zum Erreichen eines maximalen spektralen Effekts einbezogen). Die rechnerische Ermittlung der K_s -Werte erfolgte an einem Wang 700 A-Rechner durch Berechnung von Regressionsgeraden.

Die spektralanalytischen Messungen wurden an folgenden Geräten vorgenommen:

- a) Perkin Elmer 356 Doppelwellenlängen-Spektrophotometer
- b) Aminco-Chance-Doppelwellenlängen-Spektrophotometer

- c) Aminco DW2 - Spektrophotometer mit optischem Zusatzgerät
- b) und c): American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA

2.7. Enzymatische Reaktionen

2.7.1. Durch mikrosomale Monooxygenasen vermittelte Hydroxylierungsreaktionen

2.7.1.1. Bestimmung der Biphenyl-Hydroxylase-Aktivität

Die Bestimmung der Biphenyl-2-Hydroxylase- und der 4-Hydroxylase-Aktivität erfolgte in Anlehnung an die Methode von Creaven et al. (1965). Alle Reaktionsschritte wurden bei indirektem Licht durchgeführt. In 25 ml Erlenmeyerkolben wurden im Eisbad folgende Substanzen zugegeben: 0,25 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5), 0,03 ml 0,1 M $MgCl_2$ und 0,62 ml H_2O ; als NADPH regenerierendes System dienten 0,38 mg NADP, 1,03 mg Glucose-6-Phosphat und 4,5 μ l Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (140 U/ml). Als Standards für 2-Hydroxy-Biphenyl bzw. 4-Hydroxy-Biphenyl dienten Ansätze mit bekannten Konzentrationen der genannten Metabolite. Die Konzentration an mikrosomalem Protein pro Ansatz betrug 1 mg/ml, wobei den Leerwerten die Mikrosomensuspension erst nach Beendigung der Inkubation zugegeben wurde. Nach 2-minütiger Präinkubation unter Schütteln bei 37°C erfolgte durch Zugabe von 25 μ l einer 80 mM methanolischen Biphenyllösung der Start der Reaktion, die nach einer Inkubationszeit von 10 min mittels 0,5 ml eiskalter 2 N HCl-Lösung im Eis gestoppt wurde. Nach Zugabe von 4 ml Heptan folgte auf

eine 10-minütige Reinkubation und Überführung der Probe in Schliffstopfenröhrchen eine Extraktion von 30 s. 3 ml der Heptanphase wurden mit 4 ml 0,1 N NaOH 1 min geschüttelt und anschließend 2 ml der wässrigen Phase (NaOH) mit 0,5 ml 0,5 N Bernsteinsäure versetzt (der resultierende pH-Wert der Probe betrug 5,5).

Bei der anschließenden Messung im Zeiss-Fluoreszenzspektrophotometer (Typ PMQ II) wurde bei einer Excitationswellenlänge von 275 nm und einer Emissionswellenlänge von 338 nm das entstandene 4-Hydroxy-Biphenyl (p-Phenylphenol) und bei einer Einstellung von 295/415 nm das gebildete 2-Hydroxy-Biphenyl (o-Phenylphenol) bestimmt. Die Auswertung erfolgte unter Einbeziehung der mitgeführten Eichstandards und nach Korrektur der bei 295/415 nm miterfaßten Fluoreszenz von 4-Hydroxy-Biphenyl.

2.7.1.2. Bestimmung der Arylhydrocarbon-Hydroxylase-Aktivität

Die Aktivität der Arylhydrocarbon-Hydroxylase- (AHH-) Aktivität wurde nach der Methode von Gielen et al. (1972) bestimmt: Die 1 ml-Ansätze enthielten 0,25 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7,25, 0,03 ml 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung, 0,62 ml H_2O und je 0,3 mg NADH bzw. NADPH; mikrosomales Protein wurde in einem Volumen von 100 μ l bis zu einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml zugegeben. Zu jeder Probe wurde ein separater Leerwert angesetzt, dem die Mikrosomensuspension erst nach Beendigung der Reaktion beigegeben wurde. Nach 2-minütiger Präinkubation bei 37° C wurde die Reaktion mit 25 μ l einer 2 mM Lösung von Benzpyren in getrocknetem Methanol (Endkonz. von BP im Ansatz 50 μ M) gestartet und nach einer Inkubationszeit von 10 min im temperierten

Schüttelwasserbad durch Zugabe von 4,25 ml eines Hexan-Aceton-Gemisches (3,25/1,00) gestoppt. Sowohl die Inkubation als auch die folgenden Schritte wurden bei indirektem Licht vorgenommen. Es schloß sich eine Extraktion an (30 s schütteln), während der die gebildeten fluoreszierenden Metabolite in die organische Phase überführt wurden. In einem zweiten Extraktionsschritt wurde ein Aliquot von 1 ml der Hexan-Phase mit 3 ml 1 N NaOH extrahiert. Im alkalischen Medium bei einer Anregungswellenlänge von 396 nm und einer Fluoreszenzwellenlänge von 522 nm erfolgte dann die Fluoreszenzmessung der Proben an einem Perkin Elmer Fluoreszenzspektrophotometer. Die Eichung des Gerätes wurde mit Chininsulfat (0,2 µg/ml) und dem reinen Lösungsmittel (0,1 N H₂SO₄) vorgenommen. Die entstandenen fluoreszierenden Produkte wurden als Fluoreszenzäquivalente aus einer Eichkurve berechnet. Eine Enzymeinheit ist definiert als die Enzymmenge, die bei 37° C pro Minute die Menge an hydroxylierten Produkten katalysiert, deren Fluoreszenz einem pmol des rekristallisierten 3-Hydroxy-Benzpyren-Standards entspricht.

2.7.1.3. Bestimmung der Anilin-p-Hydroxylase-Aktivität

Die aromatische Hydroxylierung von Anilin wurde - basierend auf einem 1949 von Brodie und Axelrod beschriebenen Verfahren (sog. Phenol-Indophenol-Methode) - durch Nachweis des entstandenen Metaboliten p-Aminophenol photometrisch anhand einer Farbreaktion ermittelt; die Durchführung des enzymatischen Tests erfolgte in Anlehnung an Versuchsbeschreibungen von Kato und Gillette (1965). Als Inkubationsmedium diente Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7,8) mit 0,3 mM NADP, 5 mM Glucose-6-Phosphat, 4 µg/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (NADPH-regenerierendes System).

Mikrosomales Protein lag in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Von jeder Mikrosomengruppe wurden separate Leerwerte angesetzt, denen kein Substrat zugefügt wurde. Im Anschluß an eine 2-minütige Präinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml Anilin (6,25 mM) zu den 2,5 ml-Ansätzen (Endkonzentration 0,25 mM Anilin im Inkubationsgemisch) gestartet und 20 min bei 37° C unter heftigem Schütteln inkubiert. Durch Mitführen fünf verschiedener Konzentrationen von p-Aminophenol als Standardsubstanz wurde für jede Bestimmungsserie eine neue Eichkurve erstellt: diese Ansätze enthielten neben regenerierendem System und Mikrosomen entsprechende Mengen einer (frisch angesetzten) 0,02 mM wässrigen p-Aminophenol-Lösung und wurden ebenfalls unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Durch Zugabe von 1,25 ml 20 %iger Trichloressigsäure zu den Proben wurde die Reaktion beendet und das ausgefällte Protein durch 15-minütiges Zentrifugieren entfernt. 1 ml des Überstandes wurde mit je 1 ml Phenolreagenz (2 g Phenol in 100 ml Wasser + 100 ml 1 N NaOH) und 1 ml 10 %iger Na₂CO₃-Lösung gut vermischt, zur Farbentwicklung ca. 60 min bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschließend die Absorption der Proben bei 623 nm im Eppendorf-Photometer gemessen.

2.7.1.4. Bestimmung der Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivität

Nach einer von Guenthner et al. (1979) entwickelten hochempfindlichen Methode, die besonders zum Nachweis Cytochrom P-450-abhängiger Monooxygenasen in Geweben mit geringem Aktivitätsspiegel geeignet ist, wurde die Aktivität der Acetanilid-4-Hydroxylase bestimmt. Wegen der hohen Ausbeute auch nach nur einmaliger Extraktion mit Äthylacetat (80 %) wurde auf einen zusätzlichen

Extraktionsschritt verzichtet. Mit Hilfe eines Hochdruckflüssigkeitschromatographie- (HPLC-) Trennschrittes sind Substrat, der Hauptmetabolit 4-Hydroxy-Acetanilid und die daneben gebildeten Hydroxylierungsprodukte 2-Hydroxy- und 3-Hydroxy-Acetanilid durch Fraktionierung leicht voneinander trennbar. Am Ende der Inkubation wurde tritiummarkiertes 4-Hydroxy-Acetanilid zugegeben; die unterschiedliche radioaktive Markierung von 4-Hydroxy-Acetanilid als Standard [^3H] und als Metabolit [^{14}C] erlaubte die Identifizierung der HPLC-Peaks bei 254 nm mittels UV-Detektor bei einer ausreichenden Konzentration des Standards und gestattete gleichzeitig eine bequeme Feststellung der Ausbeute, so daß die Notwendigkeit einer quantitativen Ausbeute bei der Aufbereitung der Proben entfiel.

Die Zusammensetzung der Inkubationslösung war folgende: Die Ansätze enthielten 0,25 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6, 0,03 ml 0,1 M MgCl_2 , 0,62 ml H_2O und je 0,3 mg NADH und NADPH. Den Proben wurden jeweils 0,5 mg mikrosomales Protein zugegeben, während die Leerwerte jeder Mikrosomengruppe ohne Protein inkubiert wurden. Durch Einpipettieren von 3,0 μmol [^{14}C]-Acetanilid (0,5 mCi/nmol) in 25 μl Aceton wurde die Reaktion gestartet und nach einer Inkubationszeit von 10 min im Schüttelwasserbad bei 37° C durch Zugabe von 4 ml eiskalter Äthylacetat-Lösung und Abkühlung der Proben im Eisbad beendet. Nachdem anschließend den Leerwerten äquivalente Mengen an mikrosomalem Protein beigemischt waren, wurden jeder Probe ca. 300 mg NaCl und 0,1 μmol 4-Hydroxy- ^3H -Acetanilid (5,0 mCi/mmol) in 10 μl Aceton zugesetzt. Es folgte eine Extraktion (10 min Schütteln bei 4° C) direkt in den Inkubationsgefäßen (Szintillationsgefäße) wobei 3 ml-Aliquots der organischen Phase abpipettiert, in Spitzröhrchen überführt und das Lösungsmittel bei Zimmertemperatur unter Stickstoffbegasung eingedampft wurden. (Hohe Temperaturen oder Anwendung von Luft zur Evaporation

begünstigen die nicht-enzymatische Oxidation von Acetanilid.) Die getrockneten Extrakte wurden in 75 μ l Äthanol aufgenommen und 15 - 25 μ l dieser Lösung der HPLC-Analyse unterworfen (Hochdruckflüssigkeitschromatograph: Waters Associates, Milford, Mass. USA).

Die Trennung erfolgte in der Umkehrphase auf einer Waters ODS-Säule (4,6 x 25 cm : μ BONDAPAK C 18) in 25 % Methanol/H₂O bei einer Durchflußrate von 2 ml/min.

Das gesamte Elutionsvolumen, das dem 4-Hydroxy-Acetanilid-Peak entspricht, wurde in Szintillationsgefäßen gesammelt, in 10 ml Aquasol gelöst und in einem Packard Tricarb Szintillationszähler (Grove, Ill., USA) simultaner Zählung von [¹⁴C]- und [³H]-Radioaktivität unterworfen.

2.7.2. Durch mikrosomale Monooxygenasen vermittelte Desalkylierungsreaktionen

2.7.2.1. Bestimmung der Äthylmorphin-N-Demethylase-Aktivität

Die Bestimmung der N-Demethylierung von Äthylmorphin wurde in Anlehnung an eine von Anders und Mannering (1966) beschriebene Methode durchgeführt, wobei der im Verlauf der Reaktion entstehende Formaldehyd mittels der Nachweisreaktion von Nash (1953) erfaßt wird. Die 1 ml-Ansätze enthielten in Soerensen-Phosphat-Puffer pH 7,4 neben Glucose-6-Phosphat (2,5 mM im Ansatz) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (3 U/ml), 1 mg mikrosomales Protein und das Substrat Dionin (Äthylmorphin) in einer Konzentration von 8 mM. In den für jede Mikrosomengruppe separat angesetzten Leerwerten war das Substrat durch die entsprechende Puffermenge substituiert, und in den Standardproben zur Erstellung einer Eichreihe wurden anstelle des Substrats unterschiedliche Volumina einer 2,3 mM Formaldehyd-Lösung eingesetzt (zwischen 10 und 150 μ l,

entsprechend Konzentrationen von 23 - 345 μM im Ansatz). Der Start der Reaktion erfolgte nach 3-minütiger Präinkubation bei 37° C unter Schütteln durch Zugabe von NADPH (0,5 mM). Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden zum Abbruch der Reaktion 0,5 ml-Aliquots der Proben zu einer jeweils vorgelegten Mischung aus je 0,25 ml 20 %iger Zinksulfat-Lösung und gesättigter Bariumhydroxid-Lösung zugegeben, gründlich gemischt und 10 min zentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes wurden zu 2 ml der frisch angesetzten Nachweislösung, einer 2 M Ammoniumacetat-Lösung mit 0,2 % (v/v) Acetylaceton, gegeben und 30 min bei 37° C unter Schütteln reinkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Zimmertemperatur konnte bei 405 nm die Absorption der Proben gemessen und anschließend die Enzymaktivität anhand der erstellten Eichkurve errechnet werden.

2.7.2.2. Bestimmung der Äthoxycoumarin-O-Deäthylase-Aktivität

Die Bestimmung der O-Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin (einem mit hoher spezifischer Aktivität von mikrosomalen Lebermonooxygenasen umgesetzten Alkyläther), die auf der Bildung des stark fluoreszierenden Metaboliten Umbelliferon (7-Hydroxycoumarin) beruht, wurde in Anlehnung an eine von Ullrich und Weber (1972) entwickelte Methode vorgenommen.

Das Inkubationsgemisch mit einem Endvolumen von 1,5 ml setzte sich zusammen aus 66 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,6 mit 17 mM MgCl_2 (3,4 mg/ml), 2,7 mM Glucose-6-Phosphat (8 mg/ml), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (2 U), mikrosomalen Protein (1mg/ml) und dem Substrat 7-Äthoxycoumarin (1 mM in Tris-Puffer) in einer Endkonzentration im Ansatz von 0,53 mM. Die Reaktion wurde gestartet durch NADPH-Zugabe (Konzentration im Reaktionsgemisch 0,1 mM). Die Leerwerte erhielten NADPH erst nach Beendigung und 1 ml Aceton schon vor Beginn

der Inkubation, um jegliche durch mikrosomale Enzyme bedingte Umsetzungen zu unterbinden. Im Anschluß an 10-minütige Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37° C wurde die Desalkylierung durch Zugabe von 1 ml Aceton zum Ansatz abgebrochen, die Erlenmeyerkolben (25 ml) zurück ins Eisbad gestellt, mit 5 ml H₂O verdünnt und nach Überführung in Zentrifugenröhrchen das gefällte Protein abzentrifugiert. Die Fluoreszenz der Proben und der Standardverdünnungsreihe (0,5 - 10,0 µM 7-Hydroxycoumarin) wurde nach Eichung des Fluorimeters mittels Puffer und 1 µM-Standardlösung bei einer Excitationswellenlänge von 385 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte nach Eichkurven.

2.7.3. Bestimmung der Epoxidhydratase-Aktivität

Ermittlung der Epoxidhydratase-Aktivität wurde nach einer von Oesch et al. (1971) entwickelten radio-metrischen Methode vorgenommen. Das Prinzip beruht darauf, daß das lipophile radioaktiv markierte Substrat, [¹⁴C]-Styroloxid zum hydrophilen Dihydrol, dem Styrolglycol metabolisiert wird und sich das gebildete Produkt durch differentielle Extraktion des Inkubationsmediums in verschiedene Lösungsmittel vollständig vom nicht umgesetzten Substrat separieren läßt. Die bei 0° C vorbereiteten Inkubationsgemische enthielten 50 µl 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 9,0, Mikrosomen (verdünnt auf ca. 4 mg Protein/ml in 66 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4) und Wasser in entsprechender Menge, um ein Endvolumen des Ansatzes von 0,2 ml zu erreichen. Auf Doppelbestimmungen wurde bei dieser Methode verzichtet und stattdessen die Reaktion mit unterschiedlichen Mengen an mikrosomalem Protein durchgeführt. Bei Verwendung von 3 verschiedenen Konzentrationen

lagen die Proteingehalte zwischen 0,5 und 2,0 mg/ml im Ansatz. Durch Zugabe von je 10 μ l [14 C]-Styroloxid ($\approx 0,43 \mu\text{M} \approx 0,035 \mu\text{Ci}$) zu den Probenansätzen wurde die Reaktion gestartet (Substratendkonzentration im Ansatz 2,2 μM) und nach 15 minütiger Inkubation bei 37° C durch Zugabe von 2,5 ml eiskaltem Petroläther beendet. Erst zu diesem Zeitpunkt wurde den mitinkubierten Leerwerten, die Mikrosomen, Tris-HCl-Puffer und Wasser in gleichen Konzentrationen wie die entsprechenden Proben enthielten, das Substrat zugesetzt. Während der folgenden Extraktion (5 min Schütteln) wurde das Substrat in die organische Phase überführt und diese nach Tiefgefrieren der Proben dekantiert. Durch Wiederholung dieses Extraktionsschrittes wurde eine vollständige Trennung vom Produkt erreicht, das in der wässrigen Phase verbleibt. Nach Extraktion des gebildeten Styrolglycol in 1 ml Äthylacetat und Trennung der Phasen wurden Aliquots (0,5 ml) in Szintillationsgefäße überführt, mit Szintillator versetzt und mit einer Zählflasche von ca. 37 % im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Externe Standards enthielten 10 μ l Styroloxid, 0,5 ml Äthylacetat und 6 ml Szintillator. Die Epoxidhydratase-Aktivität konnte aus der Zahl der in den Proben gefundenen Zerfälle/min (dpm) - nach Abzug der Leerwerte - unter Einbeziehung der Standardwerte berechnet werden.

2.8. Analyse des cytosolischen TCDD-Rezeptors

Es wurden ähnliche Präparationsschritte vorgenommen wie sie bereits für die Charakterisierung des Östrogen-Rezeptors in Brustdrüsen- und Uterusgewebe erprobt worden waren (Okey et al., 1978 u. 1978a). Die Bestimmung des Rezeptors wurde nach einer kürzlich

von Okey et al. (1979) beschriebenen Methode durchgeführt. Zur Vorbereitung der Proben für die Saccharose-Dichtegradientenanalyse wurde 1 ml Cytosol mit 10 nM 2,3,7,8-[1,6-³H]-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin [³H]-TCDD) versetzt und mit oder ohne Zusatz von 1 µM unmarkiertem TCDD 60 min bei 0° C inkubiert. Die Zugabe von [³H]-TCDD erfolgte in einem Volumen von 12 µl p-Dioxan/ml Cytosol. Das gleiche Lösungsmittel fand auch für unmarkiertes TCDD Verwendung. Nach der Inkubation konnte ungebundenes oder nur schwach gebundenes TCDD eliminiert werden, indem die Cytosolprobe einem Dextran-Aktivkohle-Sediment (10 mg Aktivkohle/1 mg Dextran, sedimentiert aus HEDG-Puffer^x) zugegeben und dieses auf einem Vortex-Mixer im Cytosolvolumen resuspendiert wurde. Im Anschluß an eine 15-minütige Inkubation der Probe bei 0° C wurde die Dextran-Aktivkohle durch Zentrifugieren (15 min bei 4 000 x g) wieder entfernt. Zur Bestimmung von "Gesamtradioaktivität" und "gebundener Radioaktivität" wurden vor und nach der Aktivkohlebehandlung Aliquots der Cytosolprobe entnommen. 300 µl der mit Aktivkohle behandelten Cytosolprobe langsam mit einer 1 ml-Glasspritze auf einen linearen Saccharosegradienten (5 - 20 % in HEDG-Puffer) geschichtet. Die Zentrifugation der Gradienten erfolgte in einem Ausschwingrotor (Beckmann Typ SW 40 Ti) bei 235 000 x g für 16 h bei 2° C. Anschließend wurden von jedem Gradienten mit Hilfe eines Gradientenfraktionierers (ISCO Model 540, Instrumentation Specialties Company, Lincoln, NE, USA) 45 Fraktionen à 0,1 ml gesammelt, die Radioaktivität jeder Fraktion bestimmt. Nach Auftragen der in jeder Fraktion gemessenen Radioaktivität (dpm) in einer Graphik zeigt sich ein Radioaktivitätsmaximum, das die spezifische [³H]-TCDD-Bindung repräsentiert.

^x HEDG-Puffer: 25 mM HEPES, 1,5 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT) und 10 % Glycerin (v/v), pH 7,6

Wie Okey et al. (1979) zeigen konnten, ist der radioaktiv markierte Ligand durch einen 100-fachen Überschuß an unmarkiertem TCDD aus der Bindung an den Rezeptor verdrängbar. Für die Berechnung des Rezeptorgehalts in fmol/mg cytosolischen Proteins wurde die Differenz der Radioaktivität zwischen dem [^3H]-TCDD-Peak und der Radioaktivitätskurve, die bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Überschusses an unmarkiertem TCDD während der Inkubation resultierte, zugrunde gelegt.

2.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Mikrosomenfraktionen wurde in Polyacrylamid-SDS-Gelen in einer Flachgelelektrophoreseapparatur (Desaga, Modell Nr. 146 300) unter Verwendung des diskontinuierlichen Puffersystems nach Laemmli (1970) vorgenommen.

2.9.1. Herstellung der Gele

Die Mikrosomenproben wurden in 0,0625 mM Tris-HCl-Puffer (pH 6,8), der Glycerin (15 %), Mercaptoäthanol (5 %) und SDS (2,3 %) enthielt, auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml verdünnt und 3 min gekocht. Nach Zugabe des Farbmarkers Bromphenolblau zu den Proben, wurden jeweils 20 µg Protein ($\approx$ 10 µl Probensuspension) der so behandelten Mikrosomen pro Gelbahn aufgetragen und bei einer Stromstärke von 20 mA in 3 %igem Polyacrylamid-Sammegel (pH 6,8) konzentriert. Die Trennung der mikrosomalen Proteine erfolgte in 10 %igem Polyacrylamid-Gel (pH 8,8) auf einer Strecke von ca. 7 - 9 cm bei einer Stromstärke von 30 mA. Die Apparatur wurde auf ca. 10⁰ C gekühlt. Fixierung und

Färbung der Gele fand über Nacht (mindestens jedoch 4 h) in einer Lösung aus 10 % Eisessig und 25 % Isopropanol in Wasser mit Zusatz von 0,05 % Coomassie blue statt. Entfärbt wurden die Gele in einer 10 % Eisessig/ 10 % Isopropanol-Lösung in einer Diffusionskammer.

Als Molekulargewichtsstandards dienten folgende Proteine (Combithek[®], Boehringer, Mannheim): RNA-Polymerase aus *E. coli* β_1 -Untereinheit 165 000, β_2 -Untereinheit 155 000, Rinderserumalbumin 68 000, RNA-Polymerase aus *E. coli* α -Untereinheit 39 000, Trypsininhibitor 21 000 Dalton.

Die Bedingungen unter denen die Gel-Elektrophorese in den USA durchgeführt wurde, waren geringfügig verändert:

1. Es wurde eine andere Flachgelelektrophorese-apparatur benutzt mit einer Trennstrecke von ca. 20 cm und einer Geldicke von nur 0,75 mm.
2. Der Probenpuffer zur Vorbereitung der Mikrosomen enthielt nur 5 % Glycerin und nur 1 % SDS, neben ca. 5 % Mercaptoäthanol. Die Proteinkonzentration betrug hier 1 mg/ml; von dieser (gekochten) Suspension wurden ca 50 bis 75 μ l/Geltasche aufgetragen.
3. Das Trenngel enthielt 7,5 % Acrylamid, und der etwa 8-stündige Elektrophoreselauf wurde bei 16 - 20^o C durchgeführt.
4. Als Molekulargewichtsstandards fanden folgende Proteine der Fa. Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) Verwendung, die wie die Mikrosomen in Probenpuffer zubereitet waren: Pepsin 34 500, Ovalbumin 43 000, Katalase 58 000 und Rinderserumalbumin 68 000 Dalton.

2.9.2. Quantitative Auswertung der Gele

Die Analyse der Gele wurde durch Densitometrie der gefärbten Proteinbanden an einem Gilford 2400 Spektrophotometer vorgenommen. Zur Quantifizierung der Proteinbanden wurden die Flächen unter den Peaks der densitometrischen Aufzeichnungen bestimmt, auf das Gesamtprotein bezogen und als dessen prozentualer Anteil angegeben. Als geeignete Methode, bei der sich Abweichungen von weniger als 5 % bei Wiederholungsbestimmungen ergaben, erwies sich Ausschneiden des densitometrisch aufgezeichneten Bandenmusters und anschließendes Auswiegen der einzelnen Peaks.

2.9.3. Spezialgele zur Bestimmung des Hämoproteinbereichs

Die Darstellung der Hämoproteine in SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte mittels Nachweis der H_2O_2 -Peroxidase-Aktivität von Cytochrom P-450 (Cytochrom P-420) nach einer von Thomas et al. (1976) entwickelten Methode. Als Bestandteil des Nachweisreagenzes wird statt des früher gebräuchlichen stark karzinogenen Benzidin ein alkyliertes Derivat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ) eingesetzt, das sich im Tierversuch als nicht karzinogen erwiesen hat.

Für die Elektrophorese wurde ein kontinuierliches Puffersystem (pH 7,4) nach Fairbanks et al. (1971) verwendet. SDS (0,1 %) wurde erst nach der Polymerisation durch einen vorgeschalteten Elektrophoreseschritt (über Nacht bei 10 mA) ins Gel eingeführt, wobei gleichzeitig der bei der Färbung störende Polymerisationskatalysator Ammoniumpersulfat eliminiert wurde. Die Zubereitung der Proben erfolgte un-

mittelbar vor der Elektrophorese, die bei 10° C mit einer Stromstärke von 30 mA in der Dunkelheit durchgeführt wurde. Als Standard für die Intensität der Färbung diente Hämin.

Freies Häm erscheint als diffuse Bande in der Nähe der Front, und eine scharfe Bande am Gelende geht vermutlich auf die Anwesenheit von Cytochrom b_5 zurück. Peroxidase-Aktivität am Anfang des Gels zeigt die unvollständige Solubilisierung der Mikrosomen durch die niedrige SDS-Konzentration im Probenpuffer an.

2.10. Statistik

Die in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Werte stellen - wenn nicht anders erwähnt - die arithmetischen Mittelwerte ($\bar{x}$) aus drei oder mehr voneinander unabhängigen Mikrosomenpräparationen dar. Alle Enzymbestimmungen und Gelanalysen wurden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt; die gemittelten Daten gingen jeweils als ein Wert in die Berechnung der Mittelwerte ein. Die Streuungen entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$).

Auf Unterschiede zwischen den Mittelwerten der verschiedenen Gruppen und der Korrelationskoeffizienten gegenüber $r = 0$ wurde mit dem t-Test nach Student für unverbundene Stichproben geprüft. Die Signifikanzgrenze wurde bei $p < 0,05$ festgelegt; abweichende Wahrscheinlichkeiten sind jeweils im Text bzw. in den Abbildungen angegeben.

Für die Untersuchungsserie mit Clotrimazol und den neuen Antimykotika (Clotrimazol-Analoga) fand der Wilcoxon-Test Anwendung (Sachs, 1969).

3. E r g e b n i s s e

3.1. Zeitverlauf einer durch Cycloheximid verzögerten Methylcholanthren-Induktion: Ausprägung induktorspezifischer gelelektrophoretischer, spektraler und enzymatischer Parameter

Die Beobachtung des Zeitverlaufs einer MC-Induktion ist bei Anwendung des traditionellen Behandlungsschemas (dreimalige Verabreichung des Induktors im Abstand von 12 h) dadurch erschwert, daß bereits wenige Stunden nach der zweiten Dosis der Induktionseffekt sehr stark ausgeprägt ist. Aus diesem Grund wurde versucht, die Induktion zu "dosieren", d.h. durch Einsatz des Proteinsynthesehemmstoffes Cycloheximid (CH) eine Verzögerung zu erreichen, um in den Anfangsphasen der Induktion die Ausbildung verschiedener MC-typischer Parameter auf eine eventuelle Parallelität im Zeitverlauf hin überprüfen zu können.

3.1.1. Gelelektrophoretische Veränderungen

3.1.1.1. Qualitative Veränderungen

In Abb.1* sind die densitometrischen Aufzeichnungen zweier in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennter Lebermikrosomenproben von unterschiedlich vorbehandelten Ratten (Öl bzw. MC) dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, daß als Folge einer MC-Induktion der Tiere charakteristische qualitative Veränderungen im Polypeptidbandenmuster auftreten. Die Veränderungen finden - wie durch Molekulargewichtsbestimmung in den Gelen mit Hilfe von Eichproteinen ermittelt

* Abb. 1 und 2 dienen der Veranschaulichung der Fragestellung und sind ähnlich in der Dissertation R.Gerlach (1977) enthalten.

wurde - vorwiegend im Bereich von 50 000 bis 60 000 Dalton statt. Dieser Gelabschnitt wurde mittels Häm-färbung als Hämoproteinzone identifiziert. Bei genauerer Betrachtung der beiden Densitogramme wird deutlich, daß der relative Anteil einer Bande mit dem Molekulargewicht von 51 000 Dalton (Bande 2), die in Mikrosomen von Kontrolltieren dominierend ist, nach MC-Vorbehandlung abnimmt, während zwei andere, in Kontrollen schwächer ausgeprägte Proteinbanden mit Molekulargewichten von 55 000 (Bande 3) und 57 000 Dalton (Bande 4) unter dem Einfluß des Induktors deutlich sichtbar zugenommen haben.

Abb. 2 demonstriert die Entwicklung dieser Veränderung im zeitlichen Verlauf einer verzögerten MC-Induktion in Gegenwart des Proteinsynthesehemmstoffes CH anhand einer Folge von densitometrischen Aufzeichnungen gelelektrophoretisch aufgetrennter Mikrosomen. Schon kurze Zeit nach Abschluß der Vorbehandlung zeigen sich im Proteinbandenmuster Unterschiede, die sich im Verlauf der Induktion verstärkt ausprägen. Am Ende der Beobachtungsperiode ist das Apocytochrom-Muster nach MC + CH-Vorbehandlung kaum noch von dem vollinduzierter MC-Mikrosomen zu unterscheiden: in beiden Fällen liegen die Banden 2, 3 und 4 zu vergleichbaren Anteilen vor. Allerdings wird deutlich, daß der Bereich von 50 000 bis 60 000 Dalton (Hämoproteinbereich) in Mikrosomen nach reiner MC-Vorbehandlung (vergl. Abb. 1) im Vergleich zu MC + CH-Vorbehandlung auffallend vergrößert ist.

Die in dieser Serie kontinuierlich zu verfolgenden qualitativen Veränderungen im "Hämoproteinbereich" (Abnahme der Bande 2 bei gleichzeitiger Zunahme der Banden 3 und 4) sind repräsentativ für fünf separate gelelektrophoretische Trennungen aus drei unabhängigen Mikrosomenpräparationen.

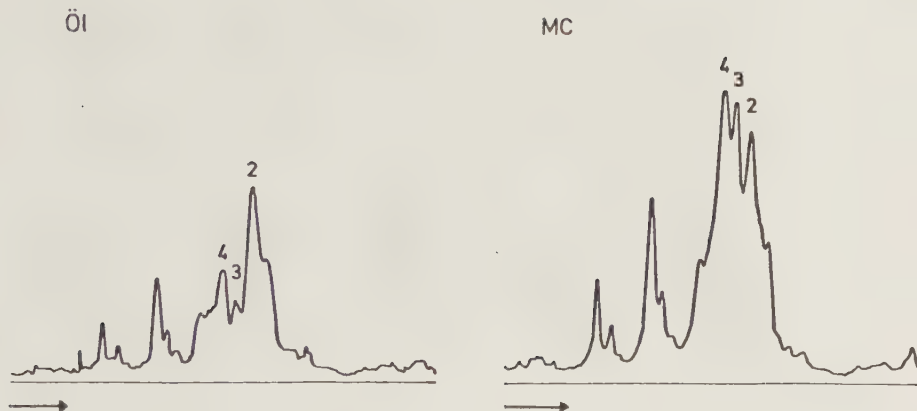


Abb. 1: Densitometrische Aufzeichnungen des Proteinbandenmusters von Rattenlebermikrosomen nach gelelektrophoretischer Auftrennung in SDS-Polyacrylamid-Gelen.

Männliche Ratten hatten 36 h zuvor die letzte von 3 Injektionen von Öl (Kontrolle) bzw. 3-Methylcholanthren (MC: 20 mg/kg) erhalten. 20 µg mikrosomalen Proteins wurden pro Gelbahn der 3 mm dicken analytischen Gele aufgetragen (vergl. 2.9.). Nach Anfärben der Gele mit Coomassie Blue erfolgte die densitometrische Aufzeichnung bei 550 nm. Die elektrophoretische Laufrichtung ist von links nach rechts (Pfeile); die mit 2, 3 und 4 bezeichneten Banden entsprechen Molekulargewichten von 51 000, 55 000 und 57 000 Dalton.

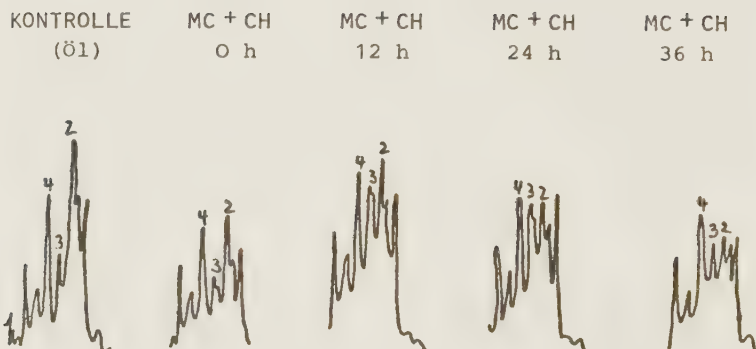


Abb. 2: Änderung des gelelektrophoretischen Proteinbandenmusters von Rattenlebermikrosomen im Zeitverlauf einer Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren (MC: 3 x 20 mg/kg) und Cycloheximid (CH: 1 mg/kg).

Die gezeigten densitometrischen Aufzeichnungen entstammen Gelen von Mikrosomenproben, die während eines gemeinsamen Elektrophoreselaufes aufgetrennt wurden. Zur besseren Übersichtlichkeit ist hier nur der Molekulargewichtsbereich von ca. 50 000 bis 60 000 Dalton (Hämoprotein-region) dargestellt. Die elektrophoretische Laufrichtung ist von links nach rechts, die mit 2, 3 und 4 bezeichneten Banden entsprechen Molekulargewichten von 51 000, 55 000 und 57 000 Dalton.

3.1.1.2. Quantitative Veränderungen

Die densitometrischen Aufzeichnungen der einzelnen Gele wurden quantitativ ausgewertet (Ermittlung der Fläche unter dem Peak) und die prozentualen Anteile der Banden - bezogen auf das im Gel nachweisbare Gesamtprotein - berechnet. Die auffälligsten Induktionseffekte waren - wie schon rein qualitativ erkennbar - bei den Banden 2, 3 und 4 zu beobachten, deren quantitative Veränderungen im Verlauf der durch CH verzögerten MC-Induktion in Abb. 3 graphisch dargestellt sind. Im Vergleich dazu werden die prozentualen Anteile dieser Banden nach Öl- und reiner MC-Behandlung angegeben (Säulen).

Bei Betrachtung der Abb. 3 fällt auf, daß der relative Anteil der Bande 2 (51 000 Dalton) am mikrosomalen Gesamtprotein nach ungehemmter Ausprägung des MC-Induktionseffektes deutlich geringer ist als in Kontrollmikrosomen. Während in letzteren die Bande 2 etwa 16 % des Gesamtproteins ausmacht, beträgt der Anteil dieser Bande in vollinduzierten MC-Mikrosomen 36 h nach der letzten Induktorgabe nur noch etwa 10 %. Bei gleichzeitiger Behandlung mit CH zeigt die Bande 2 im Verlauf des 36-stündigen Beobachtungszeitraums einen prozentualen Abfall auf einen Endwert von ebenfalls etwa 10 %.

Die Verhältnisse für die 55 000 Dalton-Bande (Bande 3) sind im mittleren Teil der Abb. 3 wiedergegeben. Ihr Anteil nimmt unter der induktiven Wirkung von MC am stärksten zu: in Ölmikrosomen beträgt ihr prozentualer Anteil am Gesamtprotein nur etwa 4 % und ist in vollinduzierten MC-Mikrosomen um etwa das Dreifache auf 12 % erhöht. Trotz des hemmenden Einflusses von CH ist schon unmittelbar nach der letzten MC-In-

jektion eine leichte Zunahme gegenüber Kontrollmikrosomen auf 6 % festzustellen, die im weiteren Verlauf markanter wird. Es folgt ein kontinuierlicher, relativ steiler Anstieg bis 36 h nach der letzten MC + CH-Behandlung, wobei der Endwert der Endwert mit 8 % jedoch um mehr als 1/3 unter dem nach ungehemmter MC-Induktion erreichten Wert liegt.

Die Bande 4 mit einem Molekulargewicht von 57 000 Dalton (Abb. 3) verhält sich insgesamt ähnlich wie Bande 3, allerdings ist die Zunahme ihres Anteils am Gesamtprotein nach Induktion mit MC etwas schwächer ausgeprägt: ihr Gehalt wird nämlich nur von 6 auf 12 % knapp verdoppelt. Während der Unterdrückung der Proteinsynthese durch CH nimmt auch der prozentuale Anteil der Bande 4 - in etwas geringerem Umfang als der der Bande 3 - zu und erreicht dabei nach 36 h ähnliche Werte wie nach ungehemmter MC-Induktion.

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, liegen sowohl bei MC-Vollinduktion (vergl. gestrichelte Säulen) als auch bei gleichzeitiger Behandlung mit Cycloheximid 36 h nach der letzten Induktorgabe alle drei Banden zu etwa gleichen Anteilen vor. In Ölmikrosomen ist dagegen die Bande 2 auffällig dominierend; ihr Anteil beträgt hier ungefähr das 4-fache von Bande 3 bzw. das 2,5-fache von Bande 4 (vergl. offene Säulen).

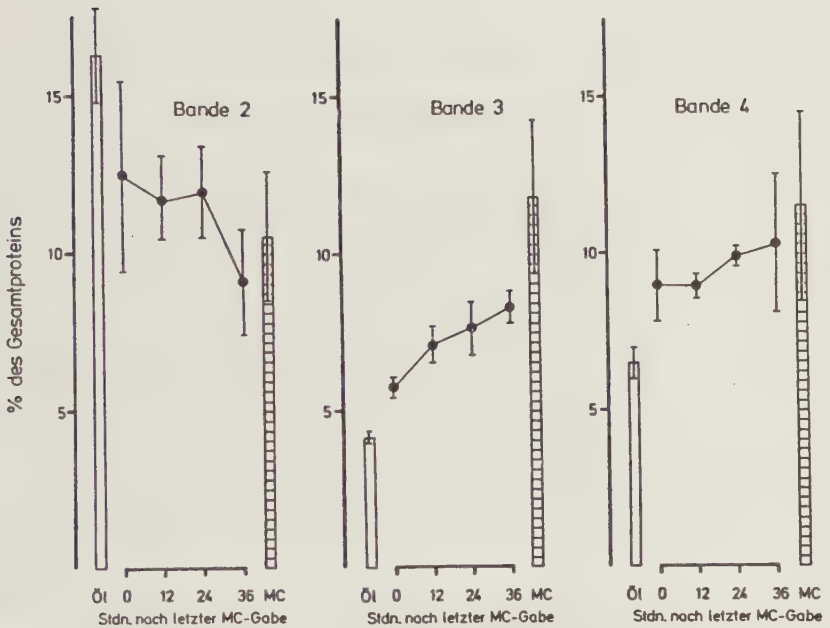


Abb. 3: Veränderungen der prozentualen Anteile der Banden 2 (51 000 d), 3 (55 000 d) und 4 (57 000 d) in SDS-Polyacrylamid-Gelen von Lebermikrosomen während der Induktion mit 3-Methylcholanthren (MC).

Männliche Ratten erhielten 3 i.p.-Injektionen von Öl (Kontrolle) oder 20 mg/kg KG im Abstand von 12 h. Für die Zeitverlaufsstudie wurde Cycloheximid (CH: 1 mg/kg) 3 h vor jeder MC-Gabe verabreicht.

Die Kurven zeigen den Zeitverlauf in Stunden nach der letzten Behandlung. Die offenen Säulen auf der linken Seite stellen die Öl-kontrollwerte dar; die gestrichelten Säulen rechts geben die Werte für ungehemmte MC-Induktion (36 h nach letzter Dosis) an. Die Quantifizierung der einzelnen Banden erfolgte durch Bestimmung der Fläche unter den Peaks der densitometrischen Aufzeichnungen (vergl. 2.9.2.) und Vergleich mit der Gesamtfläche der Molekulargewichtsregion von ca. 20 000 - 200 000 Dalton ("Gesamtprotein"). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_x$ aus drei voneinander unabhängigen Mikrosomenpräparationen und fünf unabhängigen Gelen.

3.1.2. Spektrale Veränderungen

3.1.2.1. Cytochrom P-450-Gehalt

Wie aus Tab. 1 zu entnehmen ist, lag der Gehalt an Cytochrom P-450 bei den gleichzeitig mit MC und CH behandelten Tieren zu allen Beobachtungszeitpunkten kaum über den entsprechenden Öl-Kontrollwerten. Obwohl in der MC + CH-Serie nach 36 h eine deutliche Zunahme des P-450-Gehaltes gegenüber der Anfangsphase des Beobachtungszeitraums zu beobachten ist, unterscheidet sich der Endwert nicht signifikant vom zeitlich korrespondierenden Kontrollwert (Öl 36 h). Der induktive Effekt von MC auf den Cytochrom P-450-Gehalt hat sich unter der CH-Hemmwirkung nur zu einem Drittel der bei ungehinderter MC-Einwirkung erreichten Steigerung ausprägen können (36 h nach ungehemmter Induktion mit MC: Erhöhung um 1 nmol/mg Protein; 36 h nach MC + CH: Erhöhung gegenüber der Kontrolle um 0,3 nmol/mg Protein).

3.1.1.2. Lage des Cytochrom P-450-CO-Komplexes

Die als Folge von MC-Vorbehandlung auftretende charakteristische Verschiebung des Absorptionsmaximums des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes zu kürzeren Wellenlängen hin wird dagegen schon unmittelbar nach der letzten CH-Gabe sichtbar, nimmt im Verlauf der Beobachtungsperiode kontinuierlich zu und erreicht nach 36 h fast das gleiche Ausmaß wie nach alleiniger MC-Vorbehandlung (vergl. Tab. 1 und Abb. 4A). Als Maß für die Verschiebung des Absorptionsmaximums wurde die Änderung des Winkels α gegenüber Ölkontrollen angegeben ($\Delta\alpha$), den Sekanten um 448 nm mit einer Horizontalen bilden (genauere Beschreibung dieser Technik unter 2.5.2.).

3.1.2.3. Affinität der reduzierten Mikrosomen für Metyrapon

Als dritter spektraler Parameter wurde für die Charakterisierung des zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten vorliegenden Cytochrom P-450-Typs die Änderung der apparenten Bindungskonstanten K_S für Metyrapon (MP) in reduzierten Mikrosomen herangezogen. Sie drückt sich nach MC-Vorbehandlung in einem auffälligen Affinitätsverlust für den Liganden im Vergleich zu Ölkontrollen aus, d.h. die zum Erreichen halbmaximaler Absorptionen notwendigen MP-Konzentrationen müssen um ein Vielfaches erhöht werden (Tab. 1 und Abb. 4B). Nach simultaner Behandlung mit CH und dem Induktor ist in den ersten 12 h nach der letzten CH-Gabe eine nur geringfügige MC-typische Veränderung der Affinität festzustellen, die sich aber im weiteren Verlauf sehr deutlich ausprägt und sich den nach Vollinduktion mit MC erhaltenen Werten nähert.

3.1.3. Änderungen der Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität

Stellvertretend für die unter dem induktiven Einfluß von MC ansteigenden Enzymaktivitäten ist in der vorliegenden Untersuchungsreihe die Bestimmung der Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität durchgeführt worden. Auch hier ist in der ersten Hälfte der Beobachtungsperiode nach MC + CH-Behandlung der induktive Effekt erst weniger stark als in Abwesenheit von CH ausgeprägt, aber gegenüber Kontrollen liegt doch bereits eine 10-fach höhere Metabolisierungsrate vor (Tab. 1 und Abb. 4C). Ein kontinuierlicher Anstieg führt nach 36 h zu Werten, die nur um weniger als ein Viertel unter denen der vollinduzierten Mikrosomen liegen.

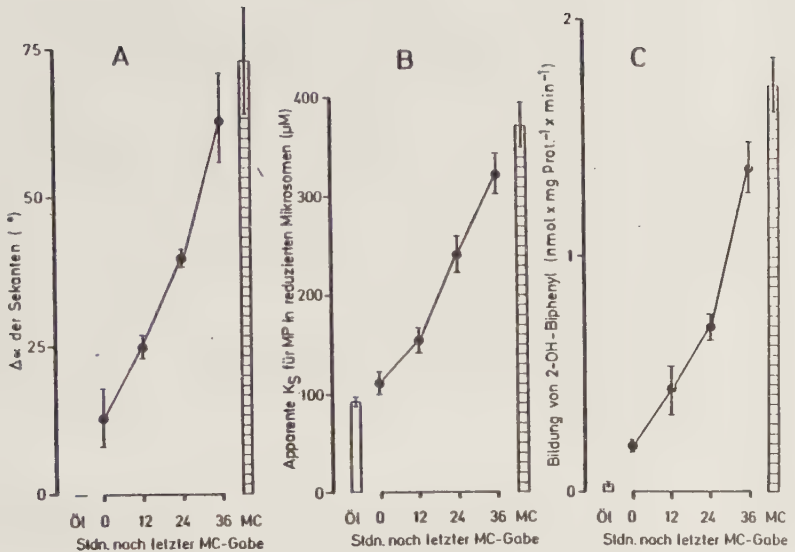


Abb. 4: Zeitverlauf von Veränderungen spektraler und enzymatischer Parameter in Rattenlebermikrosomen während der Induktion mit 3-Methylcholanthren (MC).

Das Behandlungsschema war das gleiche wie in Abb. 3 beschrieben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_x$ aus drei voneinander unabhängigen Präparationen.

A: Verschiebung des Cytochrom P-450-CO-Komplexes gegen 448 nm (zur Lokalisierung des Absorptionsmaximums wurde die in den Methoden unter 2.6.2. näher erläuterte Sekantentechnik benutzt, in der die Differenz in der Lage des Maximums gegenüber Ölkontrollen als $\Delta \alpha$ α [°] ausgedrückt wird).

B: Apparente spektrale Bindungskonstante K_S für Metyrapon (MP) in reduzierten Mikrosomen.

C: Biphenyl-2-Hydroxylierung

3.1.4. Korrelationen

Zur Klärung der Frage, ob eine der unter dem Einfluß von MC ansteigenden gelelektrophoretischen Banden präferentiell einem der getesteten spektralen und enzymatischen Parametern zugeordnet werden kann, wurden Korrelationsberechnungen angestellt. Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität, Lage des Absorptionsmaximums des Cytochrom P-450-CO-Komplexes und Affinität reduzierter Mikrosomen für Metyrapon (= apparente Bindungskonstante K_S) zum einen und die gelelektrophoretischen Banden 2, 3 und 4 zum anderen wurden zu diesem Zweck in Beziehung gesetzt. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten r sind in Tab. 2 aufgeführt.

Man erkennt eine sehr enge Korrelation der spektralen und enzymatischen Eigenschaften der Mikrosomen mit den prozentualen Anteilen der Bande 3 (Biphenyl-2-OH/Bande 3: $r = 0,81$; K_S /Bande 3: $r = 0,82$; $\Delta\alpha$ /Bande 3: $r = 0,76$). Weniger auffällige korrelative Beziehungen bestehen zwischen den untersuchten Parametern und den Veränderungen im Anteil der Bande 4 (Biphenyl-2-OH/Bande 4: $r = 0,66$; K_S /Bande 4: $r = 0,51$; $\Delta\alpha$ /Bande 4: $r = 0,62$). Die in einigen Fällen negativen Korrelationskoeffizienten machen deutlich, daß die 51 000 Dalton-Bande in keinerlei Beziehung zu MC-typischen Eigenschaften der Mikrosomen steht und demzufolge eine eigene, nicht MC-induzierbare Cytochrom P-450-Gattung repräsentiert.

Tab. 2: Korrelationen zwischen spektralen und enzymatischen Eigenschaften von Rattenlebermikrosomen und dem gelelektrophoretischen Bandenmuster mikrosomaler Proteine

	Prozentualer Anteil am Gesamtprot.		
	Bande 2 (51 000 d)	Bande 3 (55 000 d)	Bande 4 (57 000 d)
Blauverschiebung des CO-Spektrums	-0,59**	0,76**	0,62**
Erhöhung der K_S für MP	-0,59**	0,82**	0,51**
Biphenyl-2- Hydroxylierung	-0,49*	0,81**	0,66**

r statistisch von 0 verschieden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Die angegebenen Werte sind Korrelationskoeffizienten r , berechnet aus den Regressionslinien. Die prozentualen Anteile einzelner, im Molekulargewichtsbereich zwischen 50 000 und 60 000 Dalton auftretender gelelektrophoretischer Banden (ausgedrückt als % vom Gesamtprotein des Gels) wurden korreliert mit spektralen und enzymatischen Daten aus jeweils identischen Mikrosomenpräparationen. Werte aus folgenden Mikrosomengruppen gingen in die Korrelationsberechnungen ein: Ö1, MC (3 x 20 mg/kg KG, 36 h nach letzter Dosis), MC + CH (0, 12, 24 und 36 h nach letzter Injektion); $n = 18$.

3.2. Zeitverlauf der induktiven Veränderungen nach einer Einzeldosis von 3-Methylcholanthren

In dieser Untersuchungsreihe sollte eine weitere Möglichkeit einer "verzögerten" MC-Induktion geprüft werden: ohne den Induktionsprozeß selbst zu hemmen, wurde hier eine Verlangsamung der in der Anfangsphase stattfindenden Veränderungen dadurch erreicht, daß im Gegensatz zum konventionellen Induktionsschema eine nur einmalige Gabe von MC erfolgte.

3.2.1. Gelelektrophoretische Veränderungen

3.2.1.1. Qualitative Veränderungen

Ebenso wie für verzögerte MC-Induktion unter dem Einfluß von CH in der vorausgegangenen Untersuchungsreihe beschrieben, wird im Zeitverlauf ungehemmter Induktion nach einer Einzeldosis von 30 mg MC/kg ein relativer Anstieg der 55 000 und der 57 000 Dalton-Bande und eine gleichzeitige relative Abnahme der Bande mit dem Molekulargewicht von 51 000 beobachtet. Die densitometrischen Aufzeichnungen der in 10 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten mikrosomalen Proteine waren 12 bzw. 36 h nach der letzten Injektion qualitativ nicht von den zeitlich korrespondierenden Mikrosomenproben nach MC + CH-Behandlung zu unterscheiden (siehe Abb.5).

3.2.1.2. Quantitative Veränderungen

Wie die quantitative Darstellung der Bandenanteile am Gesamtprotein veranschaulicht (Abb. 6A, Tab. 3), findet

eine zeitliche Differenzierung zwischen den beiden Banden 3 und 4 nicht statt, sondern es erfolgt vielmehr wie bei MC + CH-Vorbehandlung eine fast gleichmäßige Zunahme beider Banden - allerdings in etwas stärkerem Ausmaß als unter dem Einfluß des Protein-synthese-Hemmstoffes. Der prozentuale Anteil der Bande 3 steigt nach MC-Einzeldosis um das 2,6-fache an (MC + CH 36 h: Erhöhung um Faktor 1,9 gegenüber Kontrolle) und erreicht dabei fast das Induktionsausmaß wie nach der traditionellen Stimulierung mit 3×20 mg MC/kg (Faktor 2,8).

Bande 4 nimmt - verglichen mit Kontrollmikrosomen - ähnlich wie in MC + CH-Mikrosomen um den Faktor 1,7 im Beobachtungszeitraum zu. Diese Steigerungsrate ist praktisch identisch mit der nach 3-maliger MC-Injektion erreichten.

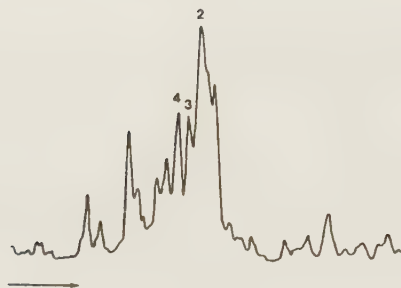
Bande 2 zeigt ein ähnliches Verhalten wie schon beschrieben, nämlich eine Abnahme um mehr als ein Viertel ihres relativen Anteils am Gesamtprotein im Vergleich zu der in Kontrollen vorliegenden Menge.

Nach abgeschlossener Induktion liegen auch in dieser Untersuchungsreihe alle drei Banden zu gleichen prozentualen Anteilen von ca. 10 % vor (Tab. 3).

3.2.2. Spektrale Veränderungen nach Einzelinduktion mit 3-Methylcholanthren

3.2.2.1. Cytochrom P-450-Gehalt

Die Gesamtausbeute an Cytochrom P-450 nach 36 h ist mit $1,81 \pm 0,16$ nmol/mg Protein im Vergleich zur MC-Stimulierung nach dem üblichen Behandlungsschema (3 Injektionen von je 20 mg/kg in 12 h-Intervallen)



NaCl

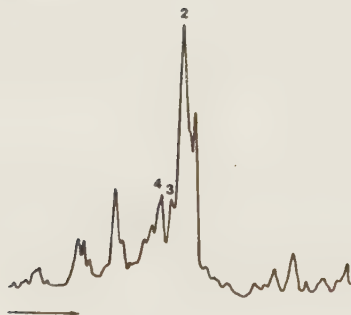
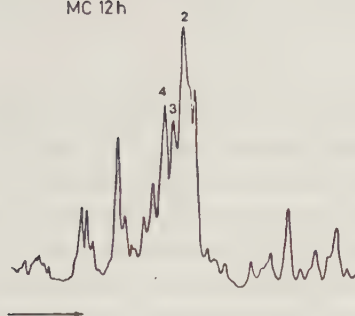


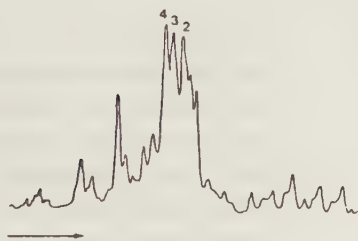
Abb. 5: Densitometrische Aufzeichnungen des Proteinbandenmusters von Lebermikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten nach gelelektrophoretischer Auftrennung in SDS-Polyacrylamid-Gelen.

Männliche Ratten hatten 12 bzw. 36 h zuvor Einzeldosen von 3-Methylcholanthren (MC: 20 mg/kg KG) Phenobarbital (PB: 80 mg/kg KG) oder eine Kombination beider Induktoren erhalten; als Kontrolle dienten mit Öl bzw. mit NaCl behandelte Tiere. 20 µg mikrosomalen Proteins wurden pro Gelbahn der 3 mm dicken analytischen Gele aufgetragen (s. 2.9.). Nach Anfärben der Gele mit Coomassie Blue erfolgte die densitometrische Aufzeichnung bei 550 nm. Die elektrophoretische Laufrichtung ist von links nach rechts (Pfeile); die mit 2, 3 und 4 bezeichneten Banden entsprechen Molekulargewichten von 51 000, 55 000 und 57 000 Dalton.

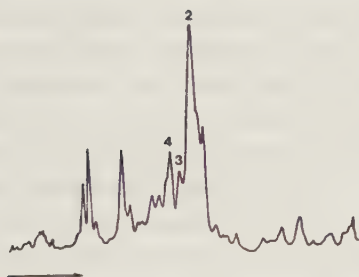
MC 12h



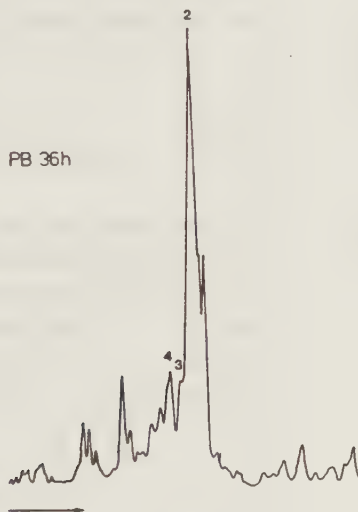
MC 36h



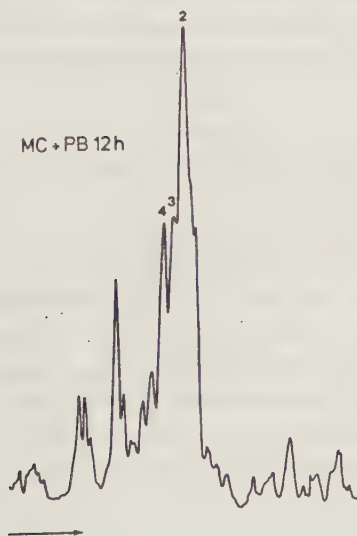
PB 12h



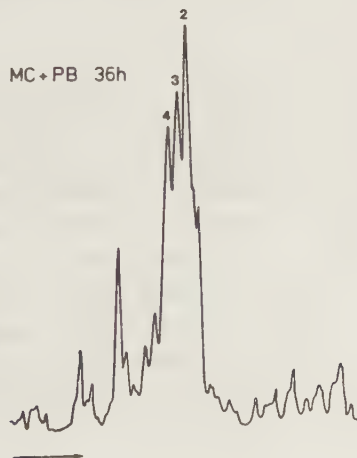
PB 36h



MC + PB 12h



MC + PB 36h



geringer (Tab. 3). Gegenüber Kontrollmikrosomen ist der Cytochrom P-450-Gehalt jedoch nach 12 h um 20 % und am Ende der Beobachtungsperiode um rund 50 % angestiegen (nach 3-facher Injektion von MC betrug die Steigerung gegenüber Kontrollen etwa 90 %). Die 36 h-Werte des Cytochrom P-450-Gehaltes nach einmaliger MC-Gabe und nach MC + CH-Vorbehandlung sind vergleichbar (MC-Einzeldosis 36 h: $1,81 \pm 0,16$ nmol/mg Protein; MC + CH 36 h: $1,71 \pm 0,14$ nmol/mg Protein).

3.2.2.2. Lage des Cytochrom P-450-CO-Komplexes

Die als Folge der MC-Behandlung sich ausprägende Verschiebung des CO-Spektrums reduzierter Mikrosomen ist in Abb. 7A dargestellt. Nach linearem Anstieg wird am Ende des Beobachtungszeitraums eine vollständige Verschiebung zu kleineren Wellenlängen hin - wie nach konventioneller 3-facher MC-Gabe - registriert (MC-3-fach-Dosis 36 h: $\Delta\alpha = 73 \pm 9^\circ$, MC-Einzeldosis 36 h: $\Delta\alpha = 72 \pm 2^\circ$). Aber auch schon in der frühen Induktionsphase ist eine leichte Blauverschiebung festzustellen, die zahlenmäßig ebenfalls (nahezu) identisch ist mit der zum vergleichbaren Zeitpunkt gemessenen Verschiebung nach MC + CH-Vorbehandlung der Ratten.

3.2.2.3. Affinität der reduzierten Mikrosomen für Metyrapon

Abb. 7B veranschaulicht den nach MC-Induktion zu erwartenden Affinitätsverlust der dithionit-reduzierten Mikrosomen für Metyrapon (MP). Die Substratkonzentration des Liganden muß linear erhöht werden, um zu den Beobachtungszeitpunkten halbmaximale Absorptionen des Cytochrom P-450-MP-Komplexes zu erreichen. Nach einmaliger MC-Gabe ist dieser MC-typische Effekt erheb-

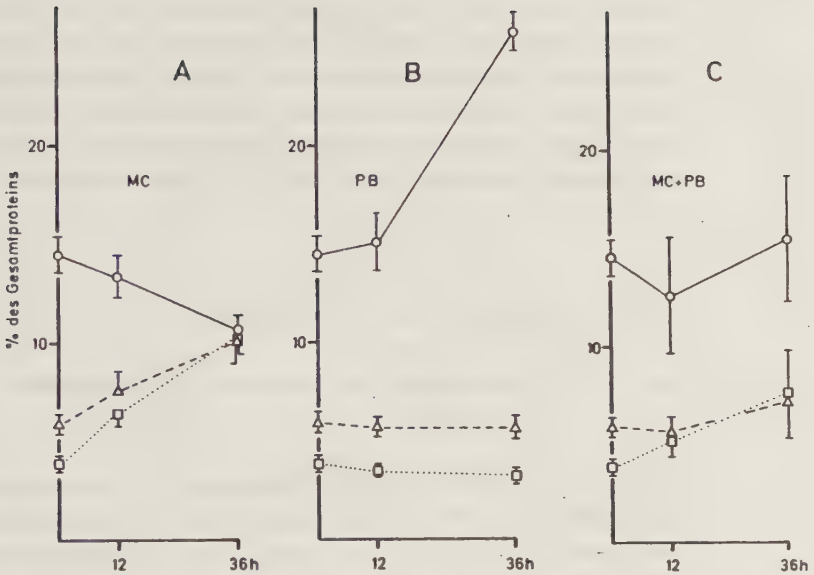


Abb. 6: Veränderungen der prozentualen Anteile der Banden 2 (51 000 d), 3 (55 000 d) und 4 (57 000 d) in SDS-Polyacrylamid-Gelen von Rattenlebermikrosomen während der Induktion mit Einzeldosen von 3-Methylcholanthren (MC), Phenobarbital (PB) oder beiden Induktoren.

Männliche Ratten erhielten 30 mg/kg MC, 80 mg/kg PB oder beide Induktoren in einem 3-Stunden-Intervall durch i.p.-Injektion. Die Kurven zeigen den Zeitverlauf in Stunden nach Gabe der genannten Induktoren. Die Quantifizierung der Banden wurde, wie in Abb. 3 beschrieben, durchgeführt.

- Bande 2
- Bande 3
- △—△ Bande 4

lich schwächer ausgeprägt als nach der üblichen Vorbehandlung. Während nach "MC-Vollinduktion" die MP-Konzentration um das 4-fache gegenüber den Kontrollen erhöht werden muß (vergl. Tab. 1, Abb. 4B), ist nach einmaliger MC-Gabe bereits eine Verdopplung der Substratkonzentration ausreichend, um halbmaximale Absorptionen des Komplexes zu erhalten (Kontrolle: 93 ± 7 , MC-3-fach-Injektion 36 h: 373 ± 23 ; MC-Einzeldosis 36 h: $202 \pm 19 \mu\text{M MP}$).

3.2.3. Enzymatische Veränderungen

3.2.3.1. Änderungen der Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität

Parallelverlaufend mit den Änderungen der untersuchten spektralen Parameter und auch den relativen Zunahmen der Banden 3 und 4 in den Gelen zeigt die Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität als Folge der einmaligen MC-Stimulierung mit 30 mg MC/kg einen vergleichbar steilen Anstieg bis zum Ende des Beobachtungszeitraums: nach 12 h ist die Aktivität gegenüber Kontrollwerten bereits deutlich erhöht, beträgt allerdings erst knapp die Hälfte der zum Zeitpunkt 36 h nach der MC-Gabe gemessenen Aktivität.

Beim Vergleich mit Tab. 1 bzw. Abb. 4C wird deutlich, daß die 2-Hydroxylase-Aktivität bei dieser Art der Vorbehandlung auch nach 36 h erst $2/3$ des mit dem traditionellen MC-Behandlungsschema erzielten Effektes erreicht (MC-3-fach-Injektion 36 h: $1,73 \text{ nmol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$).

Tabelle 3: Veränderungen spektraler, enzymatischer und gelelektrophoretischer Parameter nach Einzeldosen von 3-Methylcholanthren, Phenobarbital und kombinierter Gabe beider Induktoren in Rattenlebermikrosomen (vergl. Abb. 6 und 7)

	P-450 ^a	Δa^b	K _S ^c	2-OH-Biphenyl ^d	K _{UMO} ^e	relativer Anteil am Gesamtprotein [%]		
						51 000 d Bande	55 000 d Bande	57 000 d Bande
Kontrolle	1,22 ± 0,14		92,8 ± 6,6	67 ± 10	10,0 ± 0,8	14,5 ± 0,9	3,9 ± 0,4	5,9 ± 0,5
PB 12 h	1,26 ± 0,09	-1,7 ± 0,6	29,0 ± 9,0*	92 ± 1	9,3 ± 1,5	15,1 ± 1,5	3,5 ± 0,3	5,7 ± 0,5
PB 36 h	1,84 ± 0,16*	-7,0 ± 1,5	5,2 ± 1,9*	163 ± 7**	16,0 ± 2,0	25,8 ± 1,0*	3,3 ± 0,4	5,7 ± 0,6
MC 12 h	1,46 ± 0,10	24,3 ± 7,3	129,5 ± 8,7	522 ± 19**	7,7 ± 1,5	13,4 ± 1,1	6,5 ± 0,7	7,6 ± 1,0
MC 36 h	1,81 ± 0,16*	72,0 ± 2,0	202,3 ± 18,8*	1 141 ± 132*	5,7 ± 1,7*	10,7 ± 0,7*	10,3 ± 0,9**	10,2 ± 1,3*
MC + PB 12 h	1,57 ± 0,16	32,7 ± 3,3	12,0 ± 3,1**	767 ± 73*	7,3 ± 0,9	12,6 ± 3,0	5,2 ± 0,8	5,7 ± 0,8
MC + PB 36 h	2,45 ± 0,28*	57,3 ± 11,7	11,0 ± 1,5*	1 303 ± 128*	13,7 ± 2,4	15,5 ± 3,2	7,6 ± 2,2	7,2 ± 1,9

Den Tieren wurden Einzeldosen von 20 bzw. NaCl (Kontrollen), MC (30 mg/kg KG), PB (80 mg/kg KG) oder beide Induktoren (mit einer Latenz von 3 h) intraperitoneal verabreicht.

Die Werte sind Mittelwerte $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ aus drei unabhängigen Mikrosomenpräparationen; * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

^a Cytochrom P-450-Gehalt (nmol x mg Prot.⁻¹)

^b Blauverschiebung des Soret-Maximums (Δa der Sekanten in λ_0) s. 2.6.2.

^c apparente Bindungskonstante für Metyrapon (μM MP)

^d Biphenyl-2-Hydroxylierung (pmol 2-OH-Biphenyl x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

^e Äthylmorphin-N-Demethylierung (nmol Formaldehyd x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

3.2.3.2. Änderungen der Äthylmorphin-N-Demethylase-Aktivität

Zusätzlich zur MC-stimulierbaren Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität wurde in dieser Untersuchungsreihe eine zweite Monooxygenase-Aktivität bestimmt, die Äthylmorphin-N-Demethylierung, von der man annimmt, daß sie präferentiell mit dem PB-induzierbaren Typ von Cytochrom P-450 in Zusammenhang steht (Sladek und Mannering, 1966, 1969; Gigon und Bickel, 1971). Da dieses Enzym demzufolge als Indikator für eine PB-artige Veränderung in der Cytochrom P-450-Population angesehen werden kann, sollte auf eine mögliche Beziehung zur 51 000 Dalton-Bande geachtet werden. Sowohl Abb. 7 als auch Tab. 3 zeigen deutlich, daß die Desalkylierung von Äthylmorphin, zu deren Bestimmung der entstehende Formaldehyd colorimetrisch nachgewiesen wird, als Folge der MC-Vorbehandlung unterdrückt ist. Während Kontrollmikrosomen noch Aktivitäten von $10,0 \pm 0,84 \text{ nmol CHO} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ aufweisen, kann nach 36 h nur noch etwa die Hälfte der Kontrollaktivität gemessen werden ($5,67 \pm 1,86 \text{ nmol CHO} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$).

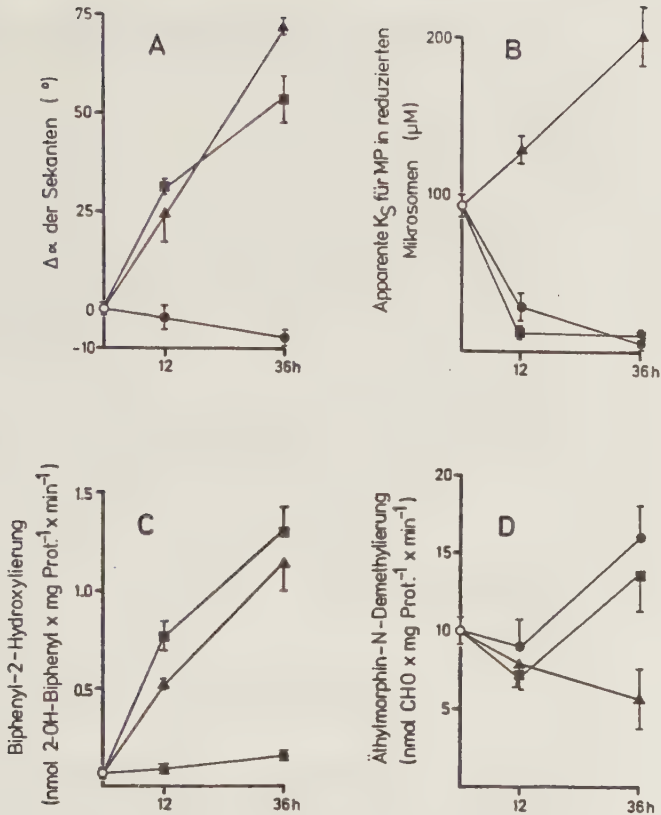


Abb. 7: Veränderungen spektraler und enzymatischer Parameter von Rattenlebermikrosomen nach Behandlung der Tiere mit Einzeldosen von 3-Methylcholanthren (MC), Phenobarbital (PB) oder beiden Induktoren.

Das Behandlungsschema war das gleiche wie in Abb. 6 beschrieben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_x$ aus drei voneinander unabhängigen Mikrosomenpräparationen.

- A: Lage des Absorptionsmaximums des Cytochrom P-450-CO-Komplexes. Zur Lokalisierung wurde die in den Methoden unter 2.6.2. näher erläuterte Sekantentechnik benutzt, in der die Differenz in der Lage des Maximums gegenüber Ölkontrollen als $\Delta \alpha$ [°] ausgedrückt wird.
- B: Apparente spektrale Bindungskonstante K_S für Metyrapon (MP) in reduzierten Mikrosomen.
- C: Biphenyl-2-Hydroxylierung
- D: Äthylmorphin-N-Demethylierung

○ Kontrolle (NaCl- oder Öl-behandelte Tiere),
 ▲—▲ MC, ●—● PB, ■—■ MC+PB.

3.3. Zeitverlauf der Induktion nach einer Einzeldosis von Phenobarbital

3.3.1. Gelelektrophoretische Veränderungen

Nachdem in den beiden vorausgegangenen Untersuchungsreihen die gelelektrophoretischen Banden 3 und 4 als MC-typisch charakterisiert worden waren, sollte das Verhalten dieser Banden im Zeitverlauf der Induktion mit einem Induktor konträren Typs beobachtet werden. Es ist bekannt, daß nach Stimulierung von verschiedenen Versuchstieren (Kaninchen, Ratten, Mäuse) mit Phenobarbital (PB) im gelelektrophoretischen Trennmuster eine Bande im Bereich zwischen 50 000 und 52 000 Dalton präferentiell induziert wird, wobei das genaue Molekulargewicht je nach Tierspezies geringfügig variiert.

3.3.1.1. Qualitative Veränderungen

Die in Abb. 5 gezeigten densitometrischen Aufzeichnungen (NaCl 36 h; PB 36 h) von gelelektrophoretisch aufgetrennten Rattenlebermikrosomen demonstrieren, daß 36 h nach intraperitonealer Applikation von 80 mg PB/kg ein ausgeprägter Zuwachs der schon in den Kontrollmikrosomen dominierenden 51 000 Dalton-Bande (Bande 2) stattgefunden hat, dies aber die alleinige sich gelelektrophoretisch manifestierende Veränderung zu sein scheint.

3.3.1.2. Quantitative Veränderungen

Während quantitativ im ersten Beobachtungsabschnitt (12h) noch keine signifikante Erhöhung der Bande 2 festzu-

stellen ist, hat sich der PB-Induktionseffekt nach 36 h deutlich ausgeprägt. Der Anteil der 51 000 Dalton-Bande am gesamten mikrosomalen Protein hat um rund 80 % im Vergleich zu Kontrollmikrosomen zugenommen. Sowohl aus der graphischen Darstellung der Veränderung der prozentualen Bandenanteile (Abb. 6B) als auch aus Tab. 3 geht hervor, daß sich die MC-typischen Banden 3 und 4 innerhalb des Beobachtungszeitraums nach PB-Vorbehandlung nicht entscheidend verändern.

3.3.2. Spektrale Veränderungen nach Einzelinduktion mit Phenobarbital

3.3.2.1. Cytochrom P-450-Gehalt

Parallelverlaufend mit der im zweiten Beobachtungsabschnitt stattfindenden Zunahme der Bande 2 nach PB-Vorbehandlung zeigt auch der Cytochrom P-450-Gehalt erst im Zeitraum zwischen 12 und 36 h nach Applikation des Induktors einen nennenswerten - dann allerdings sehr steilen - Anstieg (Tab. 3 und Abb. 6B). Während nach 12 h der Cytochrom P-450-Gehalt noch nicht über dem Kontrollniveau liegt, erfolgt in der anschließenden Phase eine drastische Zunahme um 50 % gegenüber den Kontrollmikrosomen (dies entspricht einer Konzentrationssteigerung um 0,62 nmol/mg Protein). Der Endwert von $1,84 \pm 0,16$ nmol/mg Protein ist zahlenmäßig direkt vergleichbar dem Gesamt-Cytochrom P-450-Gehalt, der 36 h nach einer Einzeldosis von MC (30 mg/kg) gefunden wurde ($1,81 \pm 0,16$ nmol/mg Protein). Allerdings lassen schon die gelelektrophoretischen Befunde keinen Zweifel darüber offen, daß es sich in den beiden Fällen um unterschiedliche Cytochrom P-450-Populationen handelt.

3.3.2.2. Lage des Cytochrom P-450-CO-Komplexes

Einen weiteren Beweis für die Verschiedenheit der nach MC- bzw. PB-Stimulierung vorliegenden Cytochrome P-450 liefert - auf spektraler Basis - die Betrachtung der Lage des Absorptionsmaximums des Cytochrom P-450-CO-Komplexes. Während nach MC-Vorbehandlung eine starke Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen hin stattfindet, ist eine derartig auffällige Verlagerung des CO-Spektrums als Folge einer PB-Induktion nicht festzustellen. Einen - wenn auch sehr schwachen - Einfluß übt jedoch auch dieser Induktor auf die Lage des Absorptionsmaximums aus. Die in Abb. 7A und Tab. 3 erkennbare geringfügige Veränderung des Sekantenwinkels $\Delta\alpha$ gegenüber Kontrollwerten entspricht einer maximalen Rotverschiebung des CO-Peaks von 450 auf 450,5 nm.

3.3.2.3. Affinität der reduzierten Mikrosomen für Metyrapon

Während der Cytochrom P-450-Gehalt und auch die gelelektrophoretische Bande 2 im ersten Beobachtungsabschnitt nur zögernd zunahm und erst in der folgenden Phase (12 - 36 h) einen starken Anstieg zeigt, ist die induktor-typische Affinitätszunahme des nach PB-Behandlung vorliegenden Cytochrom P-450 für den Liganden Metyrapon (MP) bereits nach 12 h deutlich ausgeprägt: Zum Erreichen der halbmaximalen Absorption wird zu diesem Zeitpunkt nur noch etwa 1/3 derjenigen MP-Konzentration benötigt, die bei Kontrollmikrosomen notwendig war, d.h. die Affinität für den Liganden hat bereits deutlich gegenüber nicht-induzierten Mikrosomen zugenommen. Im Verlauf der folgenden 24 h prägt sich die Affinitätszunahme noch weiter aus; der Hauptanteil dieser spezifischen Veränderung

hat sich jedoch - wie aus Abb. 7B hervorgeht - bereits in den ersten 12 h nach der Stimulierung vollzogen.

3.3.3. Enzymatische Veränderungen

3.3.3.1. Veränderungen der Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität

Der Effekt, den Phenobarbital auf die Aktivität der Biphenyl-2-Hydroxylase in der Leber ausübt, ist fast um eine Größenordnung geringer als die Aktivitätssteigerungen, die eine MC-Vorbehandlung der Ratten bewirkt. Es ist ein leichter kontinuierlicher Anstieg zu erkennen: 36 h nach PB-Behandlung wird das 2,4-fache der Kontrollwerte erreicht (Abb. 7C, Tab. 3).

3.3.3.2. Veränderungen der Äthylmorphin-N-Demethylase-Aktivität

Abb. 7D zeigt eine zweite - im Gegensatz zur Biphenyl-2-Hydroxylierung präferentiell durch PB stimulierbare - enzymatische Kennreaktion, die N-Demethylierung von Äthylmorphin, die durch MC-Behandlung sogar verringert wird. Bei Behandlung mit PB erfolgt in den letzten 24 h der Beobachtungsperiode eine auffällige Zunahme der Demethylierungsrate von Dionin, so daß 36 h nach Applikation des Induktors eine 60 %ige Steigerung des Substratumsatzes gemessen werden kann. Die Ausprägung dieser sich erst in der zweiten Beobachtungsphase deutlich manifestierenden PB-typischen Veränderung verläuft - wie auch die Zunahme des Cytochrom P-450-Gehaltes - fast parallel mit der relativen Zunahme der PB-induzierbaren Bande 2 im gelelektrophoretischen Trennmuster der mikrosomalen Proteine (Abb. 6B, Abb. 7D).

3.4. Zeitverlauf einer Mischinduktion mit Phenobarbital und 3-Methylcholanthren

In der folgenden Serie sollen die von den beiden Induktoren konträren Typs, MC und PB, hervorgerufenen unterschiedlichen Effekte auf gelelektrophoretische, spektrale und enzymatische Eigenschaften der Rattenlebermikrosomen bei kombinierter Behandlung untersucht werden. Dominanz eines der beiden Induktoren zu definierten Zeitpunkten könnte zur differenzierten Zuordnung der Banden zu bestimmten spektralen oder enzymatischen Parametern beitragen.

3.4.1. Gelelektrophoretische Veränderungen nach Mischinduktion mit Phenobarbital und 3-Methylcholanthren

3.4.1.1. Qualitative Veränderungen

Als Folge einer simultanen Behandlung mit den Induktoren MC und PB treten im gelelektrophoretischen Proteinbandenmuster nur geringfügige Veränderungen auf (siehe Abb.5) .

3.4.1.2. Quantitative Veränderungen

Auch quantitativ treten nur geringfügige Verschiebungen in den prozentualen Anteilen der Banden in der Hämproteinregion auf. Die als PB-typisch charakterisierte Bande 2 zeigt im Verlauf der 36-stündigen Beobachtungsperiode keine auffälligen prozentualen Veränderungen und bleibt wie in den Kontrollmikrosomen

dominant. Während auch Bande 4 innerhalb des Beobachtungszeitraums mit 6 - 7 % nahezu unverändert bleibt, findet eine Zunahme des prozentualen Anteils der Bande 3 am Gesamtprotein statt: 12 h nach Gabe der Induktoren ist diese Bande gegenüber Kontrollwerten bereits um 30 % angestiegen und 36 h nach der Behandlung hat sich ihr Anteil mit ca. 8 % fast verdoppelt (Abb. 6C, Tab. 3).

3.4.2. Spektrale Veränderungen

Im spektralen Bereich vollziehen sich im Gegensatz zu den gelelektrophoretischen Befunden sehr auffällige Veränderungen als Folge der Mischinduktion mit MC und PB.

3.4.2.1. Cytochrom P-450-Gehalt

Der Cytochrom P-450-Gehalt hat bereits 12 h nach der Behandlung um rund 30 % gegenüber den Kontrollwerten zugenommen und erreicht im Verlauf der folgenden 24 h einen Wert von $2,45 \pm 0,28$ nmol/mg Protein was einer Steigerung von 100 % im Vergleich zum Ausgangswert entspricht. Die Behandlung mit beiden Induktoren alleine hatte jeweils eine Erhöhung der Cytochrom P-450-Konzentration von ca. 50 % gegenüber den Kontrollwerten bewirkt; die simultane Behandlung der Ratten mit beiden Induktoren zeigt also bei rein quantitativer Betrachtung einen deutlich additiven Effekt auf den Cytochrom-Gehalt.

3.4.2.2. Lage des Absorptionsmaximums im Soret-Bereich

Einer eindeutig MC-artigen Verschiebung unterliegt - wie Abb. 7A verdeutlicht - das Absorptionsmaximum des

reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes: In den ersten 12 h nach der Stimulierung mit beiden Induktoren hat eine ebenso starke MC-artige Differenzierung wie nach alleiniger Gabe des polycyclischen Aromaten stattgefunden. Im folgenden Zeitraum prägt sich die mit Hilfe der Sekantentechnik ermittelte Verschiebung noch stärker aus und erreicht nach 36 h 80 % des nach reiner MC-Induktion gemessenen Wertes (MC + PB 36 h: $\Delta\alpha = 57,3^\circ \pm 11,7^\circ$, MC-Einzelinduktion 36 h: $\Delta\alpha = 72,0^\circ \pm 2,0^\circ$).

3.4.2.3. Affinität der reduzierten Mikrosomen für Metyrapon

Eine völlig gegensätzliche Entwicklung verglichen mit der MC-typischen Blauverschiebung des CO-Spektrums nimmt als dritter spektraler Parameter die apparente Bindungskonstante für Metyrapon (MP): Schon nach 12 h ist die Affinität für den Liganden drastisch angestiegen, d.h. schon eine sehr geringe MP-Konzentration im Ansatz reicht aus, um halbmaximale Absorption zu erreichen. Dies macht deutlich, daß hochaffine Bindungsstellen für MP induziert werden, ohne daß im gelelektrophoretischen Muster erkennbare PB-typische Veränderungen in Form einer prozentualen Zunahme der 51 000 Dalton-Bande nachzuweisen sind. In den folgenden 24 h ergibt sich keine Veränderung mehr. Der 12 h- und der 36 h-Wert sind mit 12 und 11 μM in dieser Gruppe direkt vergleichbar und entsprechen der Affinität von ca. 5 μM MP 36 h nach alleiniger PB-Gabe (Abb. 7, Tab. 3).

3.4.3. Enzymatische Veränderungen nach Mischinduktion mit Phenobarbital und 3-Methylcholanthren

Die induktiven Wirkungen auf die untersuchten Monoxygenase-Aktivitäten lassen - wie auch die Veränderungen im spektralen Bereich - eine deutliche Divergenz erkennen: Es werden sowohl PB-typische als auch MC-typische Aktivitätszunahmen erkennbar.

3.4.3.1. Änderungen der Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität

Die Biphenyl-2-Hydroxylierung erfährt nach simultaner Behandlung der Ratten mit PB und MC ebenso wie nach reiner MC-Induktion eine starke Steigerung. Die Aktivitäten liegen sogar etwas höher als die nach alleiniger MC-Gabe erreichten; da PB ebenfalls eine, wenn auch sehr geringe Aktivitätssteigerung bewirkt, deutet dies auf einen additiven Effekt hin. Die 12 h nach abgeschlossener Vorbehandlung in den Mikrosomen gemessene Bildung von 2-Hydroxy-Biphenyl ist - verglichen mit der Kontrollaktivität - um den Faktor 11,5 gesteigert und liegt rund 50 % über dem zeitlich entsprechenden MC-Wert.

Obwohl auch nach 36 h die Umsatzrate der mischinduzierten Mikrosomen noch etwas über dem MC-Einzelinduktionswert liegt, ist dieser Unterschied statistisch nicht mehr signifikant.

3.4.3.2. Änderungen der Äthylmorphin-N-Demethylase-Aktivität

Der Metabolismus von Äthylmorphin wird im Gegensatz zur 2-Hydroxylierung von Biphenyl PB-artig beeinflusst:

36 h nach Vorbehandlung der Tiere hat die N-Demethylase-Aktivität 85 % des korrespondierenden PB-Wertes erreicht (Kontrolle: $10,0 \pm 0,8$; MC + PB 36 h: $13,7 \pm 2,4$; PB 36 h: $16,0 \pm 2,0$ nmol CHO x mg Protein⁻¹ x min⁻¹). Diese Steigerung von 37 % gegenüber den Kontrollwerten ist allerdings statistisch nicht gesichert.

3.5. Korrelationen (Einzeldosis-Studie)

Tab. 4 zeigt die Korrelationen zwischen spektralen und enzymatischen Eigenschaften der Mikrosomen nach Einzeldosen von MC und PB bzw. beiden Induktoren und den densitometrisch-quantitativen Auswertungen der nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese erhaltenen mikrosomalen Proteintrennmuster.

Drei der untersuchten Parameter (Verschiebung des Absorptionsmaximums des Cytochrom P-450-CO-Komplexes, Affinität der reduzierten Mikrosomen für Metyrapon und Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität) korrelieren eng mit den prozentualen Anteilen sowohl der Bande 3 als auch der Bande 4 (Tab. 4). Auch in dieser Versuchsreihe scheint eine bevorzugte Korrelation der genannten, für eine Induktion mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen charakteristischen Veränderungen mit der Bande 3 vorzuliegen; allerdings sind die Unterschiede zu den korrespondierenden Korrelationskoeffizienten für Bande 4 schwächer ausgeprägt als in der vorausgegangenen Studie nach dreimaliger Verabreichung von MC und simultaner Gabe von Cycloheximid zum Induktor.

Tab. 4: Korrelationen zwischen spektralen und enzymatischen Eigenschaften von Rattenlebermikrosomen und dem gelelektrophoretischen Bandenmuster mikrosomaler Proteine (Einzeldosis-Studie)

	Prozentualer Anteil am Gesamtprot.		
	Bande 2 (51 000 d)	Bande 3 (55 000 d)	Bande 4 (57 000 d)
Blauverschiebung des CO-Spektrums	-0,81**	0,94**	0,75**
Erhöhung der K_S für MP	-0,79**	0,89**	0,81**
Biphenyl-2- Hydroxylierung	-0,48*	0,88**	0,74**
Äthylmorphin-N- Demethylierung	0,85**	-0,60**	-0,69**

r statistisch von 0 verschieden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Die angegebenen Werte sind Korrelationskoeffizienten r , berechnet aus den Regressionslinien. Die prozentualen Anteile einzelner, im Molekulargewichtsbereich zwischen 50 000 und 60 000 Dalton auftretender gelelektrophoretischer Banden (ausgedrückt als % vom Gesamtprotein des Gels) wurden korreliert mit spektralen und enzymatischen Daten aus jeweils identischen Mikrosomenpräparationen. Werte aus folgenden Mikrosomengruppen gingen in die Korrelationsberechnungen ein: Kontrollen (36 h), MC- und PB-Mikrosomen (12, und 36 h nach Einzeldosis des Induktors) und mischinduzierter Mikrosomen MC + PB (12 und 36 h nach Applikation beider Induktoren); $n = 18$.

Die Äthylmorphin-N-Demethylierung, deren spezifische Aktivität durch PB-Vorbehandlung deutlich zu steigern war, zeigt erwartungsgemäß eine enge Korrelation mit der PB-induzierbaren Bande 2 (Äthylmorphin-N-Demethylase/Bande 2: $r = 0,85$); mit den MC-typischen Banden 3 und 4 besteht eine negative Korrelation (Tab. 4) (Äthylmorphin-N-Demethylase/Bande 3: $r = -0,60$; Äthylmorphin-N-Demethylase/Bande 4: $r = -0,69$), worauf die nach MC-Induktion beobachtete Verringerung des Metabolismus schon hindeutete.

3.6. Untersuchungen zur ontogenetischen Entwicklung des cytosolischen Rezeptors der Cytochrom P-450-Induktion durch polycyclische Kohlenwasserstoffe

In der Leber vier verschiedener Tierspezies (Ratte, Maus, Kaninchen und *Sigmodon hispidus*) wurde in Abhängigkeit des Alters der Gehalt an cytosolischem Rezeptor für die Induktion von Cytochrom P-450 durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe bestimmt. Es wurde versucht, die Aktivitäten verschiedener induzierbarer mikrosomaler Monooxygenasen mit dem jeweils entsprechenden Rezeptorgehalt im Cytosol in Beziehung zu setzen.

3.6.1. Ontogenetische Ausprägung des Gehalts an cytosolischem Rezeptor in der Leber

Nach Inkubation von Lebercytosol-Proben von Kontroll- und BNF-behandelten Tieren mit Tritium-markiertem 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) erscheint im Saccharose-Dichtegradienten ein Radioaktivitätsmaximum spezifischer [^3H]-TCDD-Bindung, das die Anwesenheit des cytosolischen TCDD-Rezeptors repräsentiert.

Beim Vergleich der Abb. 8 - 11 (obere Kurven) wird deutlich, daß in Ratte, Maus, Kaninchen und *Sigmodon hispidus* der Gehalt an TCDD-Rezeptor im Cytosol der Leberzelle während der Ontogenese einen ähnlichen Verlauf nimmt: In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft war der Rezeptor in den fetalen Lebern erstmalig nachweisbar, zeigte ein Konzentrationsmaximum kurz nach der Geburt, und in allen Fällen lag der Rezeptorgehalt bei erwachsenen Tieren erheblich niedriger. Dies gilt sowohl für Ölkontrollen als auch für BNF-behandelte Tiere.

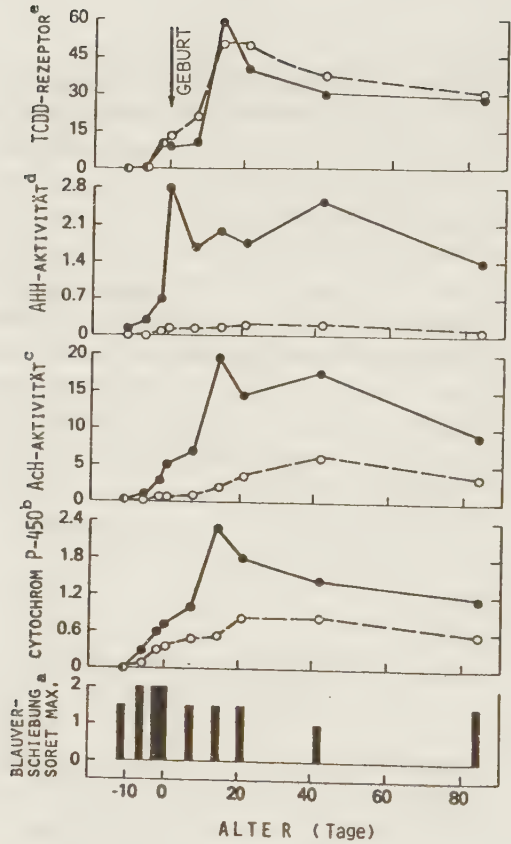


Abb. 8: Gehalt des cytosolischen Rezeptors, mikrosomale Arylhydrocarbon-Hydroxylase- (AHH-) und Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivitäten, Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber und Ausmaß der Blauverschiebung des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes nach β -Naphthoflavin-Behandlung von Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren in Abhängigkeit des Alters.

Die Anzahl der Kontrolltiere zu den entsprechenden Zeitpunkten betrug 33, 37, 28, 16, 2, 2, 2, 3 bzw. 3, die der BNF-behandelten Ratten betrug entsprechend 27, 25, 20, 9, 2, 2, 2, 2 bzw. 2 (o--o Kontrolle, ●--● BNF).

- a Verschiebung des Soret-Maximums gegenüber Kontrollen [nm]
- b [nmol/mg mikrosomales Protein]
- c [nmol 4-OH-Acetanilid x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹]
- d [nmol 3-OH-Benzpyren x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹]
- e [fmol/mg cytosolisches Protein]

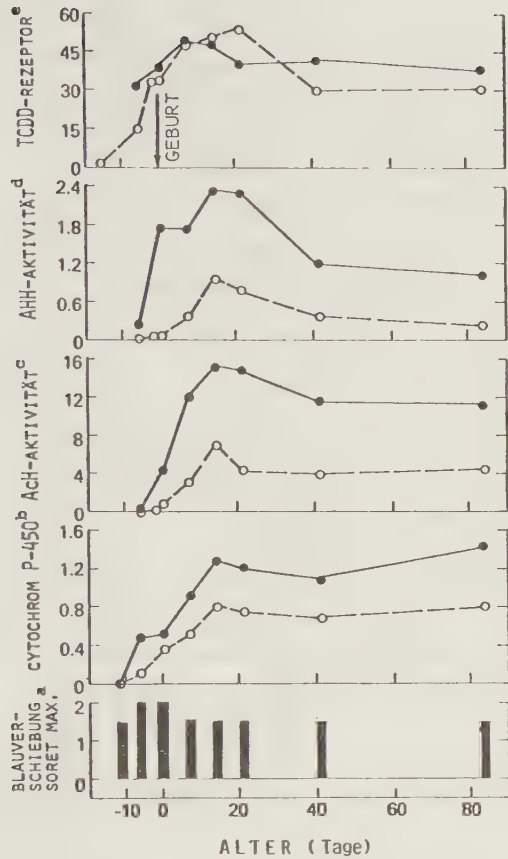


Abb. 9: Gehalt des cytosolischen Rezeptors, mikrosomale Arylhydrocarbon-Hydroxylase- (AHH-) und Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivitäten, Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber und Ausmaß der Blauverschiebung des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes nach β -Naphthoflavon-Behandlung von Mäusen (C57BL/6N) im Vergleich zu Kontrolltieren in Abhängigkeit des Alters.

Die Anzahl der Kontrolltiere zu den entsprechenden Zeitpunkten betrug 28, 13, 64, 34, 30, 30, 5 bzw. 3 die der BNF-behandelten Mäuse betrug entsprechend 47, 17, 20, 20, 20, 5 bzw. 2 (o---o Kontrolle, ●—● BNF).

a - e : siehe Abb. 8

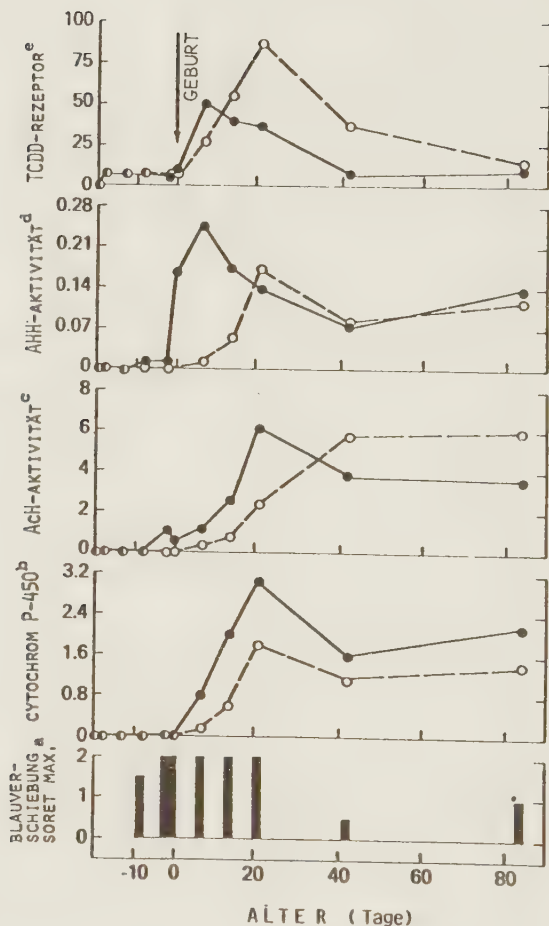


Abb. 10: Gehalt des cytosolischen Rezeptors, mikrosomale Arylhydrocarbon-Hydroxylase- (AHH-) und Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivitäten, Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber und Ausmaß der Blauverschiebung des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes nach β -Naphthoflavin-Behandlung von Kaninchen im Vergleich zu Kontrolltieren in Abhängigkeit des Alters.

Die Anzahl der Kontrolltiere zu den entsprechenden Zeitpunkten betrug 13, 7, 20, 20, 5, 4, 2, 2, 2, 2 bzw. 2, die der BNF-behandelten Kaninchen betrug entsprechend 8, 8, 20, 8, 6, 3, 2, 2, 2, 2 bzw. 2 (o--o Kontrolle, ●--● BNF).

a - e : siehe Abb. 8

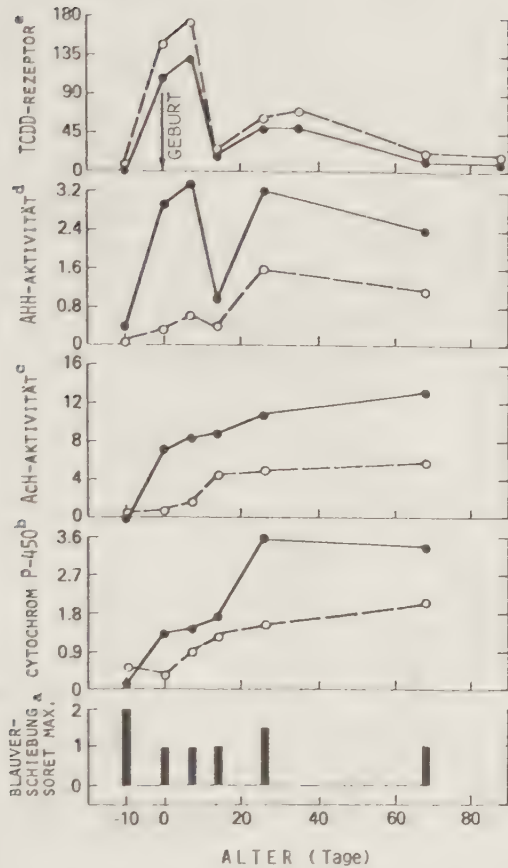
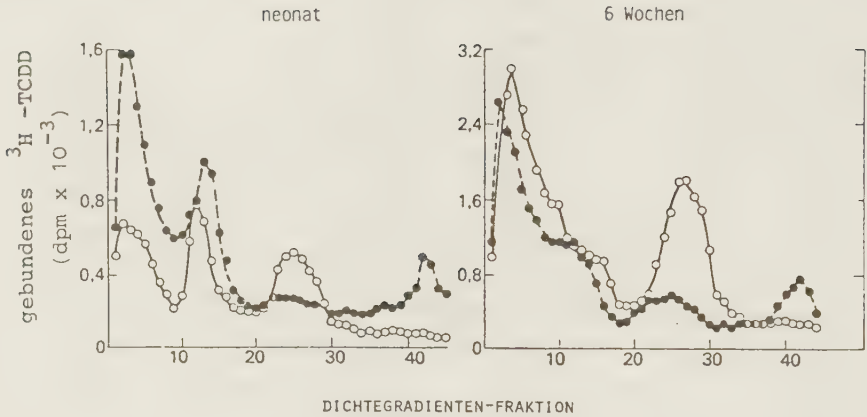


Abb. 11: Gehalt des cytosolischen Rezeptors, mikrosomale Arylhydrocarbon-Hydroxylase (AHH-) und Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivitäten, Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber und Ausmaß der Blauverschiebung des reduzierten Cytochrom P-450-OO-Komplexes nach β -Naphthoflavon-Behandlung von *Sigmodon hispedis* im Vergleich zu Kontrolltieren in Abhängigkeit des Alters.

Die Anzahl der Kontrolltiere zu den entsprechenden Zeitpunkten betrug 4, 8, 2, 4, 1, 3, 2 bzw. 2, die der BNF-behandelten *S. hispedis* betrug entsprechend 7, 6, 2, 3, 1, 3, 2 bzw. 2 (o--o Kontrolle, ●—● BNF).

a - e : siehe Abb. 8

RATTE



MAUS

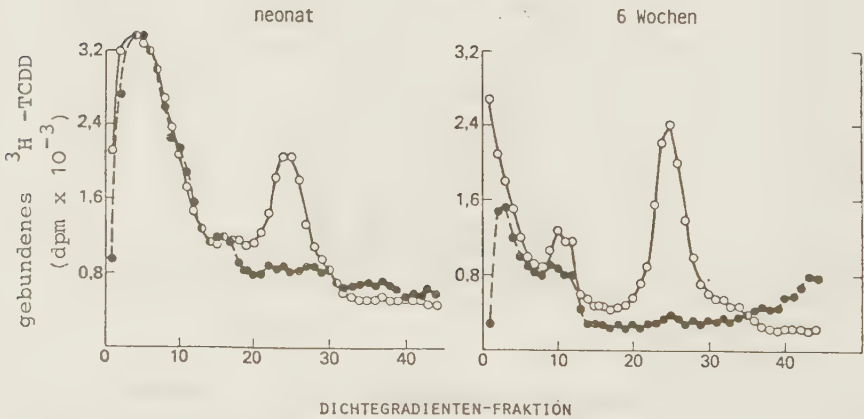
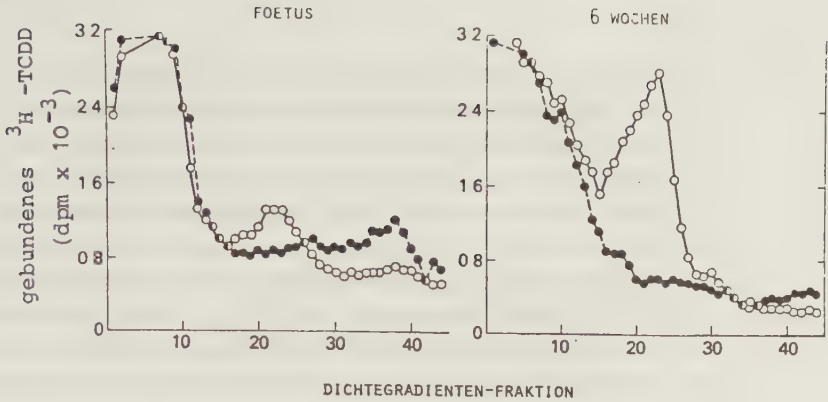


Abb. 12: Spezifische $[^3\text{H}]$ -TCDD-Bindung im Lebercytosol von neugeborenen und 6 Wochen alten Ratten (obere Kurven) und Mäusen (untere Kurven) dargestellt an einem charakteristischen Einzelexperiment.

Die Inkubation des Cytosols erfolgte mit 10 nM $[^3\text{H}]$ -TCDD (o—o). Der Anteil der unspezifischen Bindung wurde durch 1 μM unmarkiertes TCDD im Inkubationsmedium bestimmt (●—●). Das Auftragen der Fraktionen von geringer zu höherer Dichte erfolgte von links nach rechts. Die berechneten Rezeptorgehalte betrugen in den dargestellten Experimenten 12 bzw. 48 fmol/mg cytosol. Prot. für neugeborene bzw. 6 Wochen alte Ratten und für die entsprechenden Mäuse 35 bzw. 55 fmol/mg cytosol. Prot. Die vier Cytosolproben stammten von Kontrolltieren (s. 2.8.).



SIGMODEN HISPEDIS

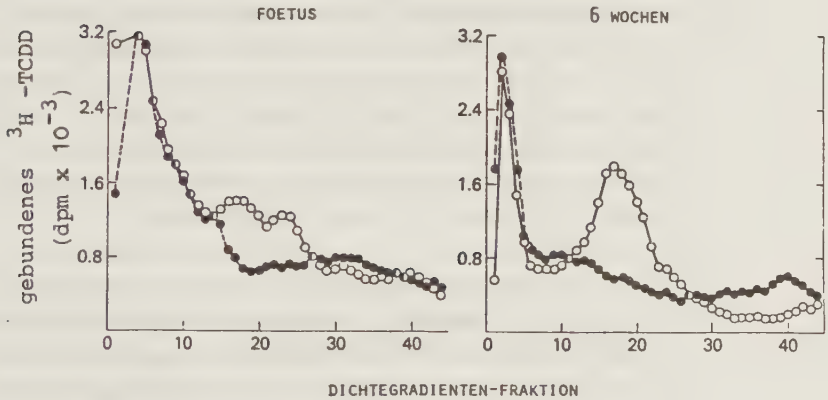


Abb. 13: Spezifische [^3H]-TCDD-Bindung im Lebercytosol von fetalen und 6 Wochen alten Kaninchen (obere Kurven) sowie fetalen und 26 Tage alten *Sigmodon hispidus* (untere Kurven) dargestellt an einem charakteristischen Einzelexperiment.

Die Inkubation des Cytosols erfolgte mit 10 nM [^3H]-TCDD (o—o). Der Anteil der unspezifischen Bindung wurde durch 1 μM unmarkiertes TCDD im Inkubationsmedium bestimmt (●—●). Das Auftragen der Fraktionen von geringerer zu höherer Dichte erfolgte von links nach rechts. Die berechneten Rezeptorgehalte betragen in den dargestellten Experimenten 8 bzw. 71 fmol/mg cytosol. Prot. für fetale bzw. 6 Wochen alte Kaninchen und für fetale und 26 Tage alte *S. hispidus* 8 bzw. 60 fmol/mg cytosol. Prot. Die vier Cytosolproben stammten von Kontrolltieren (s. 2.8.).

Eine auffällige Zunahme der Rezeptorkonzentration war bei der Ratte in der zweiten Woche (Abb. 8) und beim Kaninchen in der ersten Woche (Abb. 10) nach der Geburt festzustellen; bei der Maus (Abb. 9) und bei *S. hispidus* (Abb. 11) begann der Rezeptorgehalt bereits zum Geburtstermin oder einige Tage vor der Geburt anzusteigen. Die höchsten Konzentrationen an cytosolischem TCDD-Rezeptor in der Leber wurde bei der Ratte im Alter von zwei Wochen (60 fmol), bei Maus und Kaninchen (jeweils unbehandelt) im Alter von drei Wochen (55 bzw. 85 fmol) und bei *S. hispidus* eine Woche nach der Geburt (175 fmol/mg cytosolisches Protein) gemessen. Eine drastische Abnahme des Rezeptorgehalts um etwa den Faktor 6 war bei *S. hispidus* zwischen der ersten und zweiten Woche nach der Geburt zu beobachten, auf die ein kleiner Wiederanstieg im Alter von etwa vier Wochen folgte. Dieser Typ von Entwicklungsmuster des Rezeptors konnte bei keiner der übrigen Spezies nachgewiesen werden.

In fast allen Altersstufen wurden im Lebercytosol der - in dieser Versuchsreihe mit BNF anstelle von MC - induzierten Tiere geringere Rezeptorkonzentrationen gemessen als in den entsprechenden Kontrollen. Dies war besonders deutlich beim Kaninchen ab der dritten Lebenswoche; nur bei der adulten Maus war dieser Effekt nicht nachweisbar.

Während bei Cytosolpräparationen aus Ratten- und Mäuselebern aller Altersstufen der TCDD-Rezeptor immer in den Fraktionen 24 - 26 erschien (Abb. 12), zeigte sich bei Proben aus Kaninchen eine Verlagerung in den Bereich geringerer Dichte des Saccharosegradienten: Der Peak für die spezifische TCDD-Bindung erschien bei 6 - 12 Wochen alten Tieren in den Fraktionen 21 - 23 (Abb. 13). Eine noch stärkere

Verschiebung des Radioaktivitätsmaximums wurde in Cytosolpräparationen aus neonaten und fetalen Kaninchenlebern festgestellt, in denen der Peak auf die Fraktionen 19 und 20 begrenzt war. In den Lebercytosolproben von *S. hispidus* erschien der Rezeptor sowohl bei neugeborenen als auch bei älteren Tieren ebenfalls in diesen beiden Fraktionen. Die in Abb. 13 für eine Foetuspräparation von *S. hispidus* dargestellte Kurve weist einen biphasischen Verlauf des Rezeptorpeaks auf (Fraktionen 17 - 23), wie er gelegentlich auch in anderen Präparationen beobachtet wurde - ein Phänomen, das aber vermutlich als Artefakt aufzufassen ist und möglicherweise auf den Angriff von lysosomalen, beim Homogenisieren der Leber freigesetzten Proteasen zurückzuführen ist.

3.6.2. Ontogenetische Ausprägung der Induzierbarkeit von Arylhydrocarbon-Hydroxylase- und Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivitäten

Die Induzierbarkeit der Arylhydrocarbon-Hydroxylase (AHH) - abzulesen an der Differenz zwischen Kontroll- und BNF-Kurven für die spezifische AHH-Aktivität - war in der Maus (Abb.9) und in *S. hispidus* (Abb. 11) gleichzeitig mit der Zunahme des Gehalts an cytosolischem TCDD-Rezeptor bereits zum Geburtstermin festzustellen, und beide Parameter erreichten bei der Maus ein Maximum im Alter zwischen 1 und 2 Wochen, bei *S. hispidus* genau eine Woche nach der Geburt. Während die ontogenetische Ausprägung der durch BNF induzierbaren AHH-Aktivität bei diesen beiden Spezies auch in der weiteren Entwicklung dem Verlauf des Rezeptorgehalts folgt, konnte bei neugeborenen Ratten (Abb.8) und Kaninchen (Abb. 10) eine deutliche Zunahme der Benzpyren-Hydroxylierung ebenfalls bereits zum Zeitpunkt der Geburt beobachtet werden, aber der auf-

fällige Anstieg der Rezeptorkonzentration fand erst einige Tage später statt (bei Kaninchen in der ersten und bei Ratten in der zweiten Woche nach der Geburt).

Die Induzierbarkeit der Acetanilid-4-Hydroxylase (ACh) zeigte während der Entwicklung von Ratte (Abb. 8) und Maus (Abb. 9) in beiden Spezies einen zum Rezeptorgehalt parallelen Verlauf, wobei eine deutliche Induzierbarkeit dieser Enzymaktivität erst einige Tage später nachweisbar war als die der AHH: Bei neugeborenen Tieren konnte nach Induktion nur eine sehr geringe Steigerung der 4-Hydroxylierung von Acetanilid festgestellt werden, die dann in der ersten und zweiten Woche voll zur Ausprägung kam. Beim Kaninchen nahm die induzierte Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivität bis zum Alter von drei Wochen kontinuierlich zu und zeigte dann ein deutliches Absinken bis unter die in Kontrollen gemessenen Werte, die erst im Alter von sechs Wochen ihr Maximum erreichen (Abb. 10).

Der Rezeptorgehalt nahm zu diesem Zeitpunkt ebenfalls drastisch ab, und auch die Benzpyren-Hydroxylierung war im Gegensatz zu den drei anderen Spezies, bei denen beide Monooxygenasen auch im erwachsenen Tier induzierbar bleiben, in 6 und 12 Wochen alten Kaninchen durch BNF-Behandlung gegenüber den gleichaltrigen Kontrolltieren nicht mehr zu steigern. Es muß darauf hingewiesen werden, daß die in der Kaninchenleber gemessenen spezifischen Aktivitäten beider Monooxygenasen sehr niedrig sind: Die Umsatzraten der Acetanilid-4-Hydroxylase betragen nur etwa die Hälfte verglichen mit denen der drei übrigen Spezies. Das Ausmaß der Benzpyren-Hydroxylierung liegt sogar um eine Größenordnung niedriger und entspricht damit Literaturdaten (Atlas et al., 1977).

Einen sehr unterschiedlichen Verlauf nahmen ACh-Aktivität und Rezeptorgehalt in *S. hispidus* (Abb. 10), wo

keinerlei Parallelität zwischen beiden Parametern gegeben war: Während der Rezeptorgehalt bis fast zur Nachweisgrenze abnahm, blieb die Hydroxylierung von Acetanilid auch in erwachsenen *S. hispedis* voll induzierbar.

Aus diesen Ergebnissen und den Darstellungen in den Abb. 8 - 11 wird ersichtlich, daß die beiden untersuchten Monooxygenase-Aktivitäten, AHH und Ach, nach Induktion mit BNF in keiner der vier Spezies direkt miteinander korrelieren. Besonders große zeitliche Verschiebungen der Induzierbarkeit der beiden Hydroxylasen wurden beim Kaninchen (2 - 3 Wochen) beobachtet. Auch bei *S. hispedis* zeigten die Entwicklungsverläufe der genannten Enzyme deutliche Abweichungen voneinander - sichtbar am Auftreten eines Minimums an basaler und induzierter Aktivität der AHH, nicht aber der Ach, zwei Wochen nach der Geburt.

Trotz der beschriebenen Unterschiede weisen Ratte und Maus bezüglich der Ontogenese des Rezeptorgehalts und der induzierbaren Aktivitäten von AHH und Ach die größten Ähnlichkeiten auf, während sowohl zum Kaninchen als auch zu *S. hispedis* sehr auffällige Differenzen bestehen. Auch untereinander zeigen die letztgenannten beiden Arten wenig Gemeinsamkeiten.

Die basalen Aktivitäten von AHH und Ach zeigten bei *S. hispedis* mit zunehmenden Alter der Tiere einen leichten Anstieg; beim Kaninchen war ein sehr deutlicher Anstieg der Ach-Aktivität mit dem Alter zu beobachten, während bei Mäusen die Hydroxylierungsraten von Benzpyren und Acetanilid zwar in den ersten beiden Wochen nach der Geburt geringfügig zunahmen, anschließend aber wieder auf ein niedriges Niveau absanken. In Lebermikrosomen unbehandelter Ratten wurden für die AHH-Aktivität im gesamten Verlauf der Ent-

wicklung nahezu unverändert niedrige Werte gemessen, während die ACh-Aktivität in den ersten sechs Wochen ansteigende Tendenz zeigte.

Aus den Abb. 8 - 11 geht deutlich hervor, daß die Ontogenese der basalen Aktivitäten von AHH und ACh in den Lebermikrosomen der vier untersuchten Spezies einen von den im Cytosol der unbehandelten Tiere gemessenen Rezeptorkonzentrationen unabhängigen Verlauf nimmt. Eine diesbezügliche Divergenz war zu erwarten, da an den beiden Hydroxylierungsreaktionen in Kontrolltieren Formen von konstitutivem Cytochrom P-450 beteiligt sind, die nicht über den Ah-Locus reguliert werden (vergl. Übersichtsarbeit: Nebert und Jensen, 1979), also auch nicht mit dessen Haupt-Genprodukt, dem TCDD-Rezeptor, in Zusammenhang stehen.

3.6.3. Entwicklung der Ausstattung mit Cytochrom P-450

Als Folge einer Vorbehandlung mit β -Naphthoflavon konnte bei Ratten (Abb. 8) und Mäusen (Abb. 9) schon vor bzw. zum Zeitpunkt der Geburt ein deutlicher Induktionseffekt auf den Cytochrom P-450-Gehalt beobachtet werden, der bei beiden Spezies im Alter von zwei Wochen mit 2,3 nmol/mg Protein (Ratte) bzw. 1,3 nmol/mg Protein (Maus) Höchstwerte erreichte. Während bei der Ratte die Induzierbarkeit mit zunehmendem Alter wieder abnimmt, verändert sich der Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber induzierter B_6 -Mäuse nur wenig und bleibt etwa auf dem einmal erreichten Niveau bei leicht steigender Tendenz im Entwicklungszeitraum zwischen 6 und 12 Wochen. Auch bei neugeborenen *S. hispidus* (Abb. 11) konnte bereits eine deutliche Induzierbarkeit von Cytochrom P-450 beobachtet werden. Im Unterschied zu Ratten

und Mäusen erfolgte jedoch bei den induzierten Tieren dieser Spezies im Verlauf der weiteren Entwicklung eine kontinuierliche Zunahme des Gesamtgehalts an Cytochrom P-450 bis zu Werten von 3,6 nmol/mg Protein im Alter von drei bis vier Wochen. Auch im ca. zehn Wochen alten Tier konnten noch 3,3 nmol Cytochrom P-450 pro mg Protein gemessen werden.

Etwas später als in den anderen drei Spezies (eine Woche nach der Geburt) war beim Kaninchen (Abb.10) eine induktive Steigerung des Cytochrom P-450-Gehalts festzustellen. Es folgt ein steiler Anstieg der induzierten P-450-Konzentration, die in drei Wochen alten Tieren mit 3,1 nmol/mg Protein ein Maximum erreicht und anschließend wieder auf etwa die Hälfte abfällt.

Bezüglich der basalen Gehalte an Cytochrom P-450 lag in allen vier Spezies ein ähnliches Entwicklungsmuster vor: Maximalwerte wurden im Alter von 2 - 3 Wochen gefunden, danach änderte sich der Cytochromgehalt nur noch wenig.

BNF induzierte in allen Altersstufen bei allen Spezies eine Blauverschiebung des Soret-Peaks des reduzierten Hämoprotein-CO-Komplexes; das Ausmaß der Verschiebung war unterschiedlich und betrug zwischen 0,5 und 2,0 nm (vergl. Abb. 8 - 11, untere Kurven). Wegen des extrem hohen Gehalts an Hämoglobin und hämatopoetischem Gewebe in der fetalen Leber, besonders in der frühen Schwangerschaftsperiode, war das Ausmaß der Verschiebung des Absorptionsmaximums um so schwieriger zu bestimmen, je jünger die Foeten waren. Aus den in den Abb. 8 - 11 dargestellten Daten kann man jedoch entnehmen, daß das Ausmaß der spektralen Verschiebung im Soret-Bereich weder mit der induzierbaren AHH- noch mit der induzierbaren AcH-Aktivität eng verknüpft ist, d.h. Cytochrom "P-448" - so benannt nach der Blauverschiebung des Spektrums gegen 448 nm - kann in keiner

der vier Spezies einer der genannten Enzymaktivitäten eindeutig zu geordnet werden.

3.6.4. Entwicklung gelelektrophoretischer Korrelate von mikrosomalen Proteinen

Nach Auftrennung der Mikrosomenfraktionen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnte, ähnlich wie bei der oben dargestellten MC-Behandlung adulter Ratten (3.1. und 3.2.), als Folge einer β -Naphthoflavon-Behandlung im mikrosomalen Proteinmuster der Leber die verstärkte Ausprägung bestimmter Banden nachgewiesen werden. Die Effekte waren in den vier untersuchten Spezies unterschiedlich und zeigten eine starke Abhängigkeit vom Alter der Tiere (Abb. 14, 14a). In den Lebermikrosomen fetaler und neugeborener Ratten wird in der Hämoproteinregion eine einzelne Bande induziert, deren Molekulargewicht etwas mehr als 56000 d beträgt. (In diesem Entwicklungsstadium war nur die Arylhydrocarbonhydroxylase-Aktivität induzierbar.) Bereits eine Woche nach der Geburt (dem Zeitpunkt, zu dem auch die Acetanilid-4-Hydroxylierung deutlich induzierbar wurde) ist daneben eine zweite (leichtere) Bande von 55000 d erkennbar, die sich im Verlauf der weiteren Entwicklung (bis zum Alter von 6 bzw. 12 Wochen) zunehmend stärker ausprägt (Abb. 14a). Das gelelektrophoretische Induktionsmuster gleicht damit dem nach MC-Behandlung in adulten Ratten gefundenen (vergl. 3.1.1. und 3.2.1.). In BNF-induzierten Mäuselebermikrosomen von 6 und 12 Wochen alten Tieren konnte der Anstieg zweier Banden von etwa 54000 und 55000 d beobachtet werden (Abb. 14a), die sich auch in den Lebern von Neugeborenen schon andeuten. Beim Kaninchen war als Folge der BNF-Behandlung in 25 Tage alten Foeten, in Neugeborenen und in 7 bis 14 Tage alten Tieren eine gelelektrophoretische Bande von knapp 57000 d induziert. Im Gegensatz dazu fiel in 3 Wochen alten und älteren Kaninchen die starke Induktion

einer 54 000 Dalton-Bande auf, die sich erstmals bei Tieren im Alter von zwei bis drei Wochen gelelektrophoretisch darstellen ließ. Außerdem blieb die schon zu sehr frühen Zeitpunkten induzierte Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 56 000 und 57 000 Dalton leicht erhöht, die vermutlich mit der von Atlas et al. (1977) als Folge einer MC-Induktion in Foeten und Neugeborenen beobachteten Cytochrom P-450-Untereinheit identisch ist.

Diese Daten bestätigen frühere gelelektrophoretische Befunde mit Lebermikrosomen von Ratten und Mäusen (Guenthner und Nebert, 1978) als auch von Kaninchen (Atlas et al., 1977).

In den Mikrosomen neugeborener *S. hispidus* wurden vorwiegend zwei Banden mit Molekulargewichten von ca. 50 000 und 54 000 Dalton induziert; in drei bis vier Wochen alten Tieren konnte man den Anstieg zweier Banden von ca. 54 000 und 57 000 Dalton beobachten. Das mikrosomale Proteinbandenmuster älterer *S. hispidus* wies damit eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit dem von sechs Wochen alten und älteren Kaninchen auf. Dies geht aus einer Reihe weiterer (hier nicht gezeigter) Gele deutlicher als aus Abb. 14 hervor. Aus Gründen besserer Übersichtlichkeit wurden in Abb. 14 nicht alle Gele der im Text erwähnten Altersstufen gezeigt. Die beschriebenen Befunde wurden jedoch jeweils in mindestens zwei unabhängigen Gelpräparationen beobachtet.



elektrophoretische Laufrichtung

Abb. 14: Gelelektrophoretische Auftrennung von Lebermikrosomen β -Naphthoflavon- oder ölbehandelter Ratten, Mäuse, Kaninchen und *Sigmodon hispidus* verschiedener Altersstufen.

Die Trennung erfolgte in einem 0,75 mm dicken Flachgel (Acrylamid-Konz. 7,5 %) unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems nach Laemmli (s. 2.9.1.). Pro Gelbahn wurden 75 μ g/75 μ l mikrosomales Protein aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandards diente eine Mischung aus je 2 μ g Rinderserumalbumin (68 000 d), Katalase (58 000 d), Ovalbumin (43 000 d) und Pepsin (34 500 d). Die gestrichelten Linien markieren die ungefähren Molekulargewichte. Die gelelektrophoretische Trennstrecke betrug ca. 20 cm (Start und Front sind nicht abgebildet). Die durch BNF induzierten Banden in den mit Coomassie Blue gefärbten Gelen sind mit Pfeilen markiert.

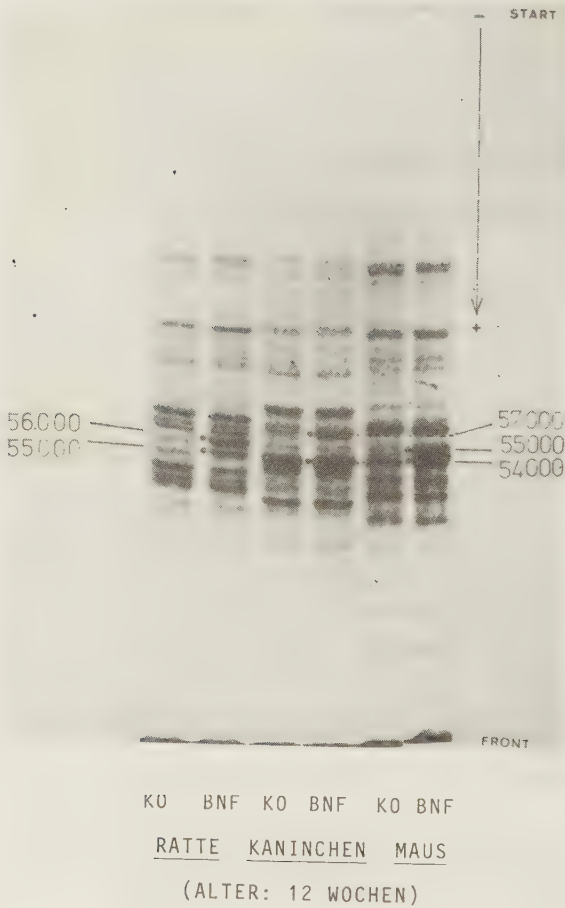
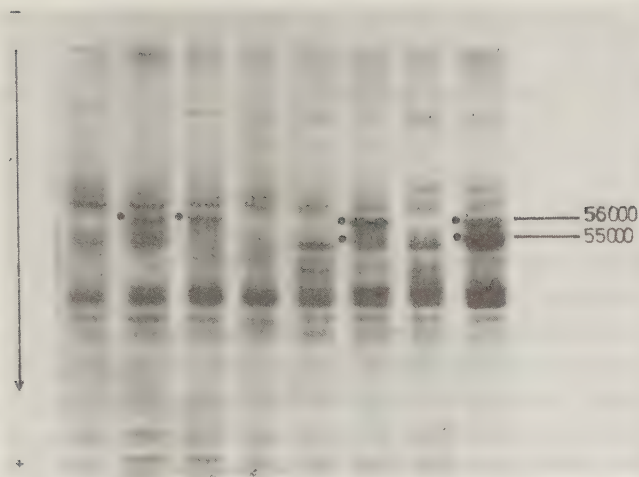


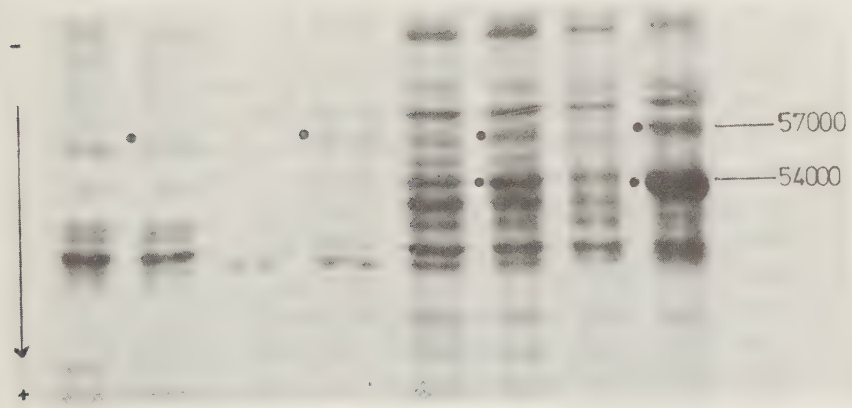
Abb. 14a: Gelelektrophoretische Auftrennung von Leber-
mikrosomen β -Naphthoflavon- oder ölbehandelter
Ratten, Mäuse und Kaninchen verschiedener
Altersstufen.

Weitere Beschreibung siehe Abb. 14.
Bei zwei Gelen ist nur jeweils ein Teilbereich dar-
gestellt, der den Molekulargewichtsbereich der sog.
Hämoproteinregion enthält (ca. 49000 bis 6000 d).



KO BNF BNF KO KO BNF KO BNF
 FETUS NEONAT 1 WOCHEN 3 WOCHEN

RATTE



KO BNF KO BNF KO BNF KO BNF
 FETUS NEONAT 2 WOCHEN 3 WOCHEN

KANINCHEN

3.7. Induktive Wirkung von Clotrimazol auf die Rattenleber

In der im folgenden Kapitel beschriebenen Induktionsstudie wurde die induzierende Wirkung einiger Antimykotika untersucht. Anhaltspunkte für eine genauere Klassifizierung dieser Induktionswirkungen gab es noch nicht; die Effekte sollten in dieser Untersuchungsreihe anhand der Auswirkungen auf verschiedene Enzymaktivitäten, auf den Cytochrom P-450-Gehalt sowie auf das gelelektrophoretische Bandenmuster der Lebermikrosomen untersucht werden. Als Vergleichssubstanz wurde der bekannte und bereits genau untersuchte Induktor Phenobarbital mit in die Versuchsreihe einbezogen.

3.7.1. Einfluß auf spektrale Parameter (Cytochrom P-450-Gehalt)

Während der Cytochrom P-450-Gehalt der Lebermikrosomen nach dreitägiger peroraler Vorbehandlung der Ratten mit jeweils 25 mg Clotrimazol/kg KG noch nicht signifikant anstieg, war bei doppelter Dosis bereits eine 80 %ige Zunahme auf $1,73 \pm 0,07$ nmol/mg Protein gegenüber Kontrollen zu beobachten. Nach Gabe von 3×100 mg Clotrimazol/kg KG stieg der Gehalt an Cytochrom P-450 auf einen Durchschnittswert von $2,14 \pm 0,40$ nmol/mg Protein an, der mehr als 100 % über den Kontrollwerten lag und dem nach konventioneller PB-Dreifachdosierung (3×80 mg/kg) erreichten Wert vergleichbar war (Tab. 5). Diese Daten lassen einen starken dosisabhängigen Induktionseffekt erkennen.

Tabelle 5: Induktion von mikrosomalen Leberenzymen durch Behandlung von Ratten mit Clotrinazol

	P-450 ^a	Xtho ^b	KOD ^c	2-Of ^d	Biphenyl 4-Of ^e	Anilin ^f	NH ₂ ^g	Et ^h	Gelelektrophoretische Daten		
									relativer Anteil am Gesamtprotein [%]		
Kontrolle (n = 6 - 9)	0,96 ± 0,06	7,0 ± 0,4	1,62 ± 0,15	78 ± 12	1,71 ± 0,28	1,10 ± 0,31	342 ± 66	14,1 ± 1,0	51 000 d Bande	55 000 d Bande	57 000 d Bande
Clotrinazol 3 x 25 mg/kg (n = 1)	1,19	10,5	2,51	115	1,32	n.d.	n.d.	n.d.	22,4 ± 1,4	6,4 ± 0,7	8,8 ± 0,4
3 x 50 mg/kg (n = 3 - 4)	1,73 ± 0,07 ^{xx}	13,3 ± 2,1 ^x	3,46 ± 0,73 ^x	250 ± 32 ^{xx}	2,93 ± 0,51	1,49 ± 0,21	586 ± 111	18,8 ± 2,7	35,5 ± 1,7 ^x	3,9 ± 0,4	6,6 ± 0,7
3 x 100 mg/kg (n = 3 - 4)	2,14 ± 0,40 ^{xx}	9,0 ± 3,2	2,77 ± 0,71	256 ± 78 ^x	1,63 ± 0,58	1,04 ± 0,25	482 ± 63	20,5 ± 1,3 ^x	44,8 ± 5,7 ^x	3,2 ± 0,2	5,0 ± 0,5
PB 3 x 80 mg/kg (n = 4 - 5)	1,95 ± 0,08 ^{xx}	13,8 ± 0,6 ^{xx}	4,62 ± 0,44 ^x	257 ± 22 ^{xx}	3,19 ± 0,49 ^x	1,86 ± 0,04 ^x	411 ± 98	26,3 ± 3,2 ^{xx}	33,3 ± 2,7 ^x	4,9 ± 0,4	7,8 ± 0,3

a Die Werte sind Mittelwerte $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ (n = Anzahl der unabhängigen Mikrosomenpräparationen); ^x p < 0,05; ^{xx} p < 0,01

b Cytochrom P-450-Gehalt (nmol x mg Prot.⁻¹)

c Äthylmorphin-N-Demethylierung (nmol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

d 7-Hydroxycoumarin-O-Deäthylierung (nmol 7-Hydroxycoumarin x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

e Biphenyl-2-Hydroxylierung (nmol 2-Hydroxybiphenyl x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

f Biphenyl-4-Hydroxylierung (nmol 4-Hydroxybiphenyl x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

g Anilin-Hydroxylierung (nmol p-Aminophenol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

h Arylhydrocarbon-Hydroxylase-Aktivität (nmol 3-Hydroxy-Benzpyren x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

i Epoxidhydratase-Aktivität (nmol Styrolglycol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

3.7.2. Einfluß auf mikrosomale Desalkylierungsreaktionen

Anders liegen die Verhältnisse bei der Äthylmorphin-N-Demethylase: Schon als Folge der niedrigsten Dosis von Clotrimazol ($3 \times 25 \text{ mg/kg}$) ist die genannte Enzymaktivität im Vergleich zu Kontrollen um 50 % angestiegen, nach Applikation von $3 \times 50 \text{ mg/kg}$ hat die Aktivität sogar um 90 % zugenommen und damit den durch $3 \times 80 \text{ mg Phenobarbital/kg KG}$ bewirkten Effekt bereits in dieser Dosierung erreicht (Tab. 5). Allerdings resultiert die Erhöhung der Clotrimazoldosis auf $3 \times 100 \text{ mg/kg}$ nicht in einer weiteren Steigerung, sondern in einem deutlichen Rückgang der Aktivitätszunahme: Gegenüber Kontrollmikrosomen ist die in dieser Versuchsgruppe gemessene Metabolisierung von Äthylmorphin nur noch um knapp 30 % erhöht.

Auch die 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylierung erfährt unter dem Einfluß der kleinsten Dosis von Clotrimazol bereits eine deutliche Steigerung auf etwa 150 % der Kontrollaktivität. Mit Verdopplung der Dosis verdoppelt sich auch die prozentuale Zunahme der O-Deäthylierungsrate, die damit um mehr als 100 % über Kontrollwerten liegt, aber nicht das Ausmaß wie bei PB-Induktion erreicht (Clotrimazol $3 \times 50 \text{ mg/kg}$: $3,46 \pm 0,73$; PB: $4,62 \pm 0,44 \text{ nmol} \times \text{mg Prot.}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Eine erneute Erhöhung der applizierten Clotrimazolmenge hat auch bei dieser Enzymreaktion eine Hemmung weiterer Aktivitätszunahme zur Folge.

3.7.3. Einfluß auf mikrosomale Hydroxylierungsreaktionen

Die Biphenyl-2-Hydroxylierung läßt sich durch Vorbehandlung der Ratten mit der niedrigsten Dosierung von Clotrimazol bereits um knapp 50 % steigern; wesentlich

größere Effekte treten allerdings bei den höheren Dosierungen auf: In den Mikrosomengruppen der mit 50 bzw. 100 mg/kg behandelten Tiere haben die Aktivitäten - ebenso wie nach PB-Vorbehandlung - um mehr als das Dreifache zugenommen.

Die Biphenyl-4-Hydroxylierung erfährt dagegen nur bei einer Dosis von 50 mg Clotrimazol/kg KG eine positive Beeinflussung: Während bei 25 und 100 mg/kg die Aktivität eine Tendenz zur Abnahme zeigt, liegt bei mittlerer Dosierung die Menge an gebildetem 4-Hydroxy-Biphenyl um 71 % über den Kontrollwerten, was mit der Zunahme dieses Metaboliten nach PB-Induktion nahezu vergleichbar ist.

Während unter dem Einfluß von Phenobarbital die Anilinhydroxylierung um etwa 70 % gesteigert wird, hat Clotrimazol in keiner der untersuchten Konzentrationen einen signifikanten Effekt auf diese Hydroxylierungsreaktion, obwohl bei mittlerer Dosierung eine leichte Tendenz zur Aktivitätszunahme festzustellen ist (Tab. 5).

Eine vierte Hydroxylierungsreaktion, die Benzpyren-Hydroxylierung (AHH), die präferentiell durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe wie 3-Methylcholanthren induzierbar ist, wobei sie eine etwa 10-fache Steigerung erfährt, wird durch Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital nicht signifikant beeinflusst. Während Clotrimazol in der hohen Dosis appliziert ebenfalls keinen Effekt auf die AHH-Aktivität hat, ist nach Behandlung der Ratten mit 3 x 50 mg/kg des Antimykotikums die Bildung von 3-Hydroxy-Benzpyren in diesen Versuchsansätzen um 70 % erhöht, obwohl bei relativ großer Streuung die Signifikanzschranken gerade überschritten sind.

3.7.4. Einfluß auf die Epoxidhydratase-Aktivität

Neben der AHH ist ein weiteres Enzym von entscheidender Bedeutung für die metabolische Aktivierung von Präkanzerogenen: die Epoxidhydratase, die für die Beurteilung der biologischen Bedeutung eines Induktionseffekts ähnlich wichtig wie die AHH ist. Im Gegensatz zur Benzpyren-Hydroxylierung, auf die PB keinen signifikanten Einfluß hat, wird die Metabolisierung von Styrol-Epoxid durch PB-Induktion deutlich gesteigert ($p < 0,025$). Eine konzentrationsabhängige Zunahme ist auch nach Clotrimazol-Vorbehandlung zu beobachten: Nach Gabe von 3×50 mg/kg nimmt die Aktivität um ein Drittel gegenüber den Kontrollwerten zu, nach doppelter Dosis des Antimykotikums beträgt die Zunahme sogar fast 50 % und unterscheidet sich damit signifikant ($p < 0,005$) von der Kontrollaktivität.

3.7.5. Veränderungen im gelelektrophoretischen Bandenmuster

Auch die Auftrennung der mikrosomalen Proteine mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt nach Behandlung der Ratten mit Clotrimazol deutliche Veränderungen des Bandenmusters - besonders im Molekulargewichtsbereich zwischen 48 000 und 60 000 Dalton, der bereits als Hämoproteinzone klassifiziert wurde (vergl. Kap. 3.1.1.).

Meist ist schon rein qualitativ in den gefärbten Gelen eine auffällig verstärkte Ausprägung einer Bande mit dem Molekulargewicht von 51 000 Dalton erkennbar, die, wie in Kap. 3.1. beschrieben, durch Phenobarbital induzierbar ist. Die Zunahme dieser Bande ist deutlich abhängig von der applizierten Menge des Antimykotikums (Tab. 5) und wird nach quantitativer Auswertung der densitometrischen Aufzeichnungen der Gelbanden schon

als Folge einer Vorbehandlung mit der niedrigsten Dosis von Clotrimazol (3 x 25 mg/kg) als Steigerung von fast 20 % erkennbar, und nach Gabe von 3 x 50 mg/kg beträgt die Zunahme der Bande über 50 % gegenüber Kontrollen und übertrifft damit geringfügig die durch PB hervorgerufene Steigerung. Nach Induktion der Tiere mit 3 x 100 mg/kg hat sich der prozentuale Anteil der Bande 2 am mikrosomalen Gesamtprotein fast verdoppelt; diese Zunahme korreliert mit der starken Steigerung des Cytochrom P-450-Gehalts als Folge der hohen Clotrimazol-Dosis.

Parallelverlaufend mit der ausgeprägten Zunahme der Bande 2 sind nach Quantifizierungen der Bandenanteile weitere weniger auffällige, aber dennoch signifikante Veränderungen zu beobachten. Die prozentualen Anteile der beiden Banden mit Molekulargewichten von 55 000 bzw. 57 000 Dalton, die unter dem Einfluß von MC einen deutlichen Anstieg zeigten (Kap. 3.1.1. und 3.2.1.) nehmen als Folge der Clotrimazol-Behandlung mit steigender Induktordosis ab. Der Anteil der 55 000 Dalton-Bande (Bande 3) verringert sich nach Applikation von 3 x 25 mg/kg um mehr als 30 %, nach 3 x 50 mg/kg um knapp 40 % und nach der höchsten Clotrimazol-Dosis sogar um 50 % gegenüber dem Anteil dieser Bande in Gelen von Kontrollmikrosomen. Etwas geringer sind die Veränderungen der Bande 4: hier beträgt die Abnahme mit steigender Clotrimazol-Dosis 9 %, 25 % bzw. 43 % gegenüber Kontrollen.

Eine Tendenz zur Verringerung der Banden 3 und 4 im gelelektrophoretischen Trennmuster zeigt sich auch in den Mikrosomen der mit einer Dreifach-Dosierung von PB vorbehandelten Ratten; der Effekt ist jedoch erheblich schwächer ausgeprägt als unter dem Einfluß von Clotrimazol. Bei nur einmaliger Gabe von 80 mg PB/kg konnte 36 h nach der Applikation eine nur ganz geringfügige Abnahme der Bande 3 festgestellt werden; die

Bande 4 hatte sich gegenüber Kontrollwerten nicht verändert (vergl. Kap. 3.3.1.).

Diese Befunde unterstreichen die in den beiden ersten Versuchsserien zum Zeitverlauf der MC-Induktion gefundene bevorzugte Korrelation der Bande 3 mit MC-spezifischen Parametern. Weiterhin ist zu erwähnen, daß sowohl nach den höheren Dosen von Clotrimazol als auch nach Phenobarbital der Anteil der Hämoproteinregion am Gesamtprotein signifikant erhöht ist (Daten tabellarisch nicht aufgeführt), wobei der Effekt als Folge der Behandlung mit 3 x 100 mg Clotrimazol/kg den Einfluß von Phenobarbital übertrifft. Die Zunahmen betragen 14 % nach 3 x 50 mg Clotrimazol/kg ($p < 0,05$), 21 % nach 100 mg/kg ($p < 0,001$) und 16 % nach PB-Gabe ($p < 0,005$).

3.8. Induktive Wirkung einiger neuentwickelter Antimykotika (Clotrimazol-Analoga) auf die Rattenleber

Im Anschluß an die Untersuchungen über die Induktionseffekte von Clotrimazol sollten drei weitere - noch nicht auf dem Markt befindliche - Antimykotika bezüglich eventueller Induktionseffekte getestet werden. Es wurde der Cytochrom P-450-Gehalt bestimmt und die gleichen Enzymaktivitäten gemessen wie unter 3.7. beschrieben; daneben wurden auch hier die gelelektrophoretischen Daten als wichtiges Hilfsmittel zur Beurteilung der Induktionseffekte herangezogen.

3.8.1. Einfluß auf spektrale Parameter (Cytochrom P-450-Gehalt)

Bezüglich des Cytochrom P-450-Gehalts zeigt sich bei allen drei untersuchten Clotrimazol-Analoga die gleiche Tendenz: es ist ein dosisabhängiger Induktionseffekt festzustellen, der allerdings hinter dem nach vergleichbarer Clotrimazol-Dosis gemessenen zurückbleibt.

Die nach Applikation von jeweils 3×100 mg/kg der einzelnen Substanzen erhaltenen Mittelwerte des Cytochrom P-450-Gehalts sind untereinander vergleichbar (BAY f 8751: $1,55 \pm 0,46$; BAY g 7155: $1,63 \pm 0,41$ bzw. BAY l 9139: $1,49$ nmol/mg Protein) und liegen noch deutlich unter der als Folge einer Induktion mit der um die Hälfte niedrigeren Clotrimazol-Dosis (3×50 mg/kg) gemessenen Menge an Cytochrom P-450. In der niedrigen Dosis (3×50 mg/kg) bewirkt BAY g 7155 den höchsten Cytochrom P-450-Anstieg (Kontrolle: $0,95 \pm 0,08$; BAY g 7155: $1,38 \pm 0,16$ nmol/mg Protein) und nur hier unterscheidet sich der Wert signifikant von Kontrollen ($p < 0,05$).

3.8.2. Einfluß auf mikrosomale Desalkylierungsreaktionen

Die Äthylmorphin-N-Demethylase wird von den drei Substanzen in gleichem Umfang beeinflusst. Nach der niedrigen Dosisierung (3×50 mg/kg) tritt eine signifikante ($p < 0,01$ für BAY f 8751 bzw. $p < 0,005$ für BAY g 7155), mehr als 50 %ige Steigerung dieser Enzymaktivität gegenüber Kontrollen ein (Tab. 6), was direkt vergleichbar ist mit dem Effekt nach einer Behandlung mit 3×25 mg/kg Clotrimazol (vergl. Tab. 5). Die N-Demethylierung nimmt um den Faktor 1,8 zu, wenn die

Tiere mit jeweils 3 x 100 mg/kg der Clotrimazol-Analoga vorbehandelt wurden (BAY f 8751: $13,1 \pm 3,5$; BAY g 7155: $13,0 \pm 2,6$ und BAY l 9139: $13,0 \text{ nmol Formaldehyd} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$).

Die spezifischen Aktivitäten sind wiederum direkt untereinander vergleichbar und entsprechen den nach Gabe von 3 x 50 mg Clotrimazol/kg gemessenen Umsetzungen.

Fast gleiche Verhältnisse sind bei der Äthoxycoumarin-O-Deäthylase zu beobachten. Auch dieses Enzym wird bereits durch 3 x 50 mg BAY g 7155 bzw. BAY l 9139/kg um ca. 50 % induziert (die Induktionswirkung von BAY f 8751 ist mit 37 % unbedeutend geringer), so daß die Aktivitäten bei 2,11 (BAY f 8751), 2,34 (BAY g 7155) und 2,32 (BAY l 9139) $\text{nmol 7-Hydroxycoumarin} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ liegen. Nach Verdopplung der applizierten Substanzmenge läßt sich generell eine dosisabhängige Zunahme der Metabolisierungsrate um 75 % (BAY f 8751), 79 % (BAY g 7155) bzw. 84 % (BAY l 9139) gegenüber Kontrollen feststellen.

Beide beschriebenen Desalkylierungsreaktionen zeigen gegenüber den verwendeten Induktoren ein ähnliches Verhalten, wobei die Induktionswirkungen von 3 x 50 mg/kg der Clotrimazol-Analoga in allen Fällen weit hinter den durch gleiche Clotrimazol-Dosis bewirkten zurückstehen.

3.8.3. Einfluß auf mikrosomale Hydroxylierungsreaktionen

Die Biphenyl-2-Hydroxylase zeigt nach einer 3 x 50 mg/kg-Dosierung von BAY g 7155 und BAY l 9139 Aktivitäten im Normalbereich (Kontrolle: 70 ± 13 ; BAY g 7155: 67 ± 30

Tabelle 6: Induktion von mikrosomalen Leberenzymen durch Behandlung von Ratten mit Clotrimazol-Analogen

	P-450 ^a	KMO ^b	KOD ^c	Biphenyl 2-OH ^d	Anilin ^e	ANH ^g	EH ^h	Gelelektrophoretische Daten		
								relativer Anteil am Gesamtprotein [%]		
Kontrolle (n = 6-9)	0,95 ± 0,08	7,1 ± 0,6	1,54 ± 0,13	70 ± 13	1,36 ± 0,20	1,17 ± 0,19	248 ± 29	51 000 d Bande	55 000 d Bande	57 000 d Bande
BAY g 8751 3 x 50 mg/kg (n = 2-3)	1,13 ± 0,16	10,8 ± 0,5 ^x	2,11	546 ± 115 ^x	1,43 ± 0,50	1,65 ± 0,14	417 ± 27	23,27 ± 1,25	6,43 ± 0,66	8,76 ± 0,40
3 x 100 mg/kg (n = 2-3)	1,55 ± 0,46 ^x	13,1 ± 3,5 ^x	2,70	932 ± 332 ^x	1,98 ± 0,93	1,75 ± 0,12	381 ± 16	24,49 ± 1,15	5,08 ± 0,37	8,68 ± 0,74
BAY g 7155 3 x 50 mg/kg (n = 2-3)	1,38 ± 0,21 ^x	11,0 ± 0,5 ^x	2,34	67 ± 30	1,08 ± 0,45	1,44	384 ± 25	27,25 ± 1,31	6,45 ± 0,77	7,82 ± 0,35
3 x 100 mg/kg (n = 2-3)	1,63 ± 0,41 ^x	13,0 ± 2,6 ^x	2,75	117	1,42 ± 0,61	1,55	435 ± 61	25,49 ± 1,82	5,64 ± 0,12	8,37 ± 0,50
BAY L 9139 3 x 50 mg/kg (n = 1-2)	1,30	11,0	2,32	88	1,15	1,88	350	27,92 ± 3,27	6,11 ± 0,58	7,92 ± 0,26
3 x 100 mg/kg (n = 1-2)	1,49	13,0	2,83	179	1,68	1,73	341	22,89	7,84	8,47
								23,92	9,09	7,67

Die Werte sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_x$ (n = Anzahl der unabhängigen Mikrosomenpräparationen); ^x p < 0,05; ^{xx} p < 0,01

- a Cytochrom P-450-Gehalt (nmol x mg Prot.⁻¹)
b Athylmorphin-N-Demethylierung (nmol Formaldehyd x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
c 7-Athoxycoumarin-O-Deethylierung (nmol 7-Hydroxycoumarin x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
d Biphenyl-2-Hydroxylierung (nmol 2-Hydroxybiphenyl x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
e Biphenyl-4-Hydroxylierung (nmol 4-Hydroxybiphenyl x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
f Anilin-Hydroxylierung (nmol p-Aminophenol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
g Aryldihydrocarbon-Hydroxylase-Aktivität (nmol 3-Hydroxy-Benzpyren x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
h Epoxidhydratase-Aktivität (nmol Styrolylcol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

und BAY 1 9139: $98 \text{ pmol } 2\text{-OH-Biphenyl} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Bei beiden Substanzen lässt sich durch Verdopplung der Induktordosis auch eine knappe Verdopplung dieser Hydroxylase-Aktivität erzielen, die aber dennoch deutlich unter den nach Clotrimazol-Behandlung gemessenen Werten bleibt. Auffallend ist im Gegensatz dazu eine extrem hohe Zunahme der Biphenyl-2-Hydroxylierung nach Behandlung der Tiere mit BAY f 8751. $3 \times 50 \text{ mg/kg}$ dieser Substanz reichen aus, um die Bildung von 2-Hydroxy-Biphenyl um fast das 8-fache zu beschleunigen und die doppelte Dosis resultiert in einer Aktivitätszunahme um den Faktor 13. Diese Aktivitäten übertreffen um mehr als das Zweifache bzw. nahezu um das Vierfache die nach Clotrimazol erreichten Höchstwerte.

Die Biphenyl-4-Hydroxylierung wird von keinem der drei neuen Antimykotika auffällig beeinflusst. Unter BAY g 7155- bzw. BAY 1 9139-Behandlung sind zwar die gemessenen Aktivitäten nach der hohen Dosis gegenüber der niedrigen leicht erhöht, liegen aber nur wenig über dem Kontrollbereich (Tab. 6). Obwohl im Vergleich dazu nach $3 \times 100 \text{ mg BAY f 8751/kg}$ die Aktivität etwas stärker angestiegen ist, liegt kein signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollen vor und die Effekte bleiben deutlich unter denen von Clotrimazol.

Ein leichter, statistisch jedoch nicht signifikanter Anstieg ist auch bei der Anilinhydroxylierung zu beobachten, wobei der Induktionseffekt bei allen drei Pharmaka praktisch dosisunabhängig ist (Tab. 6). Die stärkste Aktivitätszunahme (50 - 60 %) tritt nach BAY 1 9139 auf, wo ähnliche Werte wie nach PB-Behandlung meßbar sind. Von einem mg Protein werden pro Minute 1,88 bzw. 1,73 nmol p-Aminophenol gebildet, während die Kontrollwerte bei $1,17 \pm 0,19 \text{ nmol}$ liegen.

Geringfügig langsamer sind die Umsetzungen nach Gabe von BAY f 8751 und - mit weiterhin abnehmender Tendenz - nach BAY g 7155 (Tab. 6); die Enzymaktivitäten sind mit denen nach Applikation von 3 x 50 mg Clotrimazol/kg gleichzusetzen (Tab. 5).

Eine schwache Induzierbarkeit weist als letzte der untersuchten Hydroxylierungsreaktionen auch die Arylhydrocarbon-Hydroxylase auf. Etwas höhere Umsatzraten von Benzpyren zum 3-Hydroxy-Metaboliten als in Kontrollansätzen wurde nach Behandlung mit den Clotrimazol-Analoga BAY f 8751 und BAY g 7155 gemessen, wobei zwischen hoher und niedriger Dosierung kein Unterschied festzustellen war (Tab. 6). Die gemessenen Aktivitäten sind mit denen nach PB-Vorbehandlung vergleichbar (Tab. 5). BAY l 9139 bewirkt dagegen kaum eine Erhöhung der Enzymaktivitäten über die Kontrollwerte (Tab. 6).

3.8.4. Einfluß auf die Epoxidhydratase-Aktivität

Auch die Epoxidhydratase weist eine Induzierbarkeit durch zumindest zwei der Clotrimazol-Analoga auf: Während die Enzymaktivität nach BAY f 8751 dosisunabhängig um 46 % ansteigt und mit einem Umsatz von 22,1 bzw. 22,0 nmol Styrolglycol x mg Protein⁻¹ x min⁻¹ die nach Clotrimazol gemessenen Höchstwerte noch übersteigt, ist der nach 3 x 50 mg/kg BAY g 7155 erreichte Induktionseffekt der gleiche wie nach Behandlung mit 3 x 100 mg Clotrimazol/kg KG. Durch Erhöhung der Dosis läßt sich keine Aktivitätssteigerung erzielen. Behandlung der Tiere mit BAY l 9139 bewirkt nur in der hohen Dosis einen sehr schwachen Anstieg der Epoxidhydratase-Aktivität auf 17,2 nmol Styrolglycol x mg Protein⁻¹ x min⁻¹.

3.8.5. Veränderungen im gelelektrophoretischen Bandenmuster

Da alle drei Clotrimazol-Analoga einen schwachen - bei den meisten der untersuchten Enzymreaktionen - PB-ähnlichen Induktionseffekt zeigten, wurde auch im gelelektrophoretischen Bild eine entsprechende Veränderung erwartet, nämlich ein Ansteigen der PB-induzierbaren 51 000 Dalton-Bande.

Die quantitative Auswertung zeigt eine schwache dosisabhängige Zunahme der Bande 2 in Mikrosomen von Tieren, die mit BAY f 8751 oder mit BAY g 7155 vorbehandelt waren. Dieser Anstieg (10 % bzw. 22 % nach BAY f 8751 und 14 % bzw. 25 % nach BAY g 7155) ist - verglichen mit der Wirkung von PB oder Clotrimazol - in beiden Fällen jedoch sehr gering. Nach BAY l 9139 bleibt der prozentuale Anteil der 51 000 Dalton-Bande am Gesamtprotein sogar auf Kontrollniveau.

Wie bei Clotrimazol-Behandlung ist auch in dieser Serie gleichzeitig mit den Veränderungen der Bande 2 eine leichte Tendenz zur Abnahme der Banden 3 und 4 festzustellen. Eine Ausnahme bildet BAY l 9139 bezüglich der Bande 3, die hier geringfügig ansteigt.

Es ist festzuhalten, daß auch die neuen Antimykotika nicht frei von Einflüssen auf die mikrosomalen Leberenzyme von Ratten sind, daß aber die induktive Wirkung geringer ist als die durch Clotrimazol ausgelöste.

3.9. Induktive Wirkung von Metyrapon und Pregnenolon-16 α -Carbonitril

In der im folgenden beschriebenen Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob das Modellpharmakon Metyrapon (MP), das zur präferentiellen Bindung an das PB-induzierbare Cytochrom P-450 und zur präferentiellen Hemmung PB-induzierbarer Enzymreaktionen verwendet wird, auch ein spezifischer Induktor dieser Cytochrom P-450-Form ist. Weiterhin wurde die Induktionswirkung von Pregnenolon-16 α -Carbonitril (PCN), einem hormonell inaktiven Steroid, auf verschiedene spektrale Parameter, eine Reihe von Hydroxylierungs- und Desalkylierungsreaktionen sowie gelelektrophoretische Charakteristika in Rattenlebermikrosomen untersucht.

3.9.1. Einfluß auf spektrale Parameter

3.9.1.1. Cytochrom P-450-Gehalt

Als Folge einer Vorbehandlung der Ratten mit Metyrapon (MP) ist bei beiden gewählten Dosierungen (3 x 50 bzw. 3 x 100 mg/kg) eine leichte Zunahme des Gehalts an mikrosomalem Cytochrom P-450 in der Leber dieser Tiere gegenüber Kochsalz-Kontrollen festzustellen (Tab. 7); während Kontrollwerte von $0,89 \pm 0,16$ nmol Cytochrom P-450/mg Protein gemessen wurden, lagen die in beiden Metyrapongruppen ermittelten Cytochrom-Gehalte mit $1,21 \pm 0,10$ (3 x 50 mg/kg) bzw. $1,23 \pm 0,05$ nmol/mg Protein (3 x 100 mg/kg) rund 40 % darüber. Allerdings entbehrt diese Steigerung einer statistischen Signifikanz ($p > 0,1$).

Dreimalige orale Gabe von 100 mg Pregnenolon-16 α -Carbonitril (PCN) pro kg führte zu einer 46 %igen Erhöhung des Cytochrom P-450-Gehalts gegenüber Gummi

arabicum-Kontrollen. Auch in diesem Fall werden die nach PB-Induktion gefundenen Werte nicht erreicht, und trotz der Steigerung von $1,00 \pm 0,05$ auf $1,46 \pm 0,20$ nmol Cytochrom P-450/mg Protein ist auch hier keine Signifikanz gegeben.

3.9.1.2. Affinität der reduzierten Mikrosomen für den Liganden Metyrapon

Die apparente Bindungskonstante K_S für Metyrapon bleibt nach Vorbehandlung der Tiere mit 3×50 mg/kg dieser Substanz auf Kontrollniveau. Nach Gabe von 3×100 mg/kg zeigt sich jedoch eine leichte Affinitätszunahme. Die MP-Konzentration im Versuchsansatz, bei der halbmaximale Bindung an das Cytochrom erreicht wird, liegt in diesem Fall bei $16,5 \pm 2,5$ μ M. Ein auffälligerer PB-artiger Effekt ist nach PCN-Vorbehandlung zu beobachten, bei der die apparente Bindungskonstante für MP nur noch $6,4 \pm 2,7$ beträgt, was im Vergleich zu Ga-Kontrollwerten eine Affinitätszunahme um Faktor 4 bedeutet ($p < 0,02$). Allerdings sind die beschriebenen Veränderungen schwächer als die unter dem induktiven Einfluß von PB stattfindenden Affinitätszunahmen, deren halbmaximale Substratsättigung schon bei einer MP-Konzentration von $2,3 \pm 0,8$ μ M ($p < 0,05$) erreicht ist (Tab. 7).

3.9.2. Einfluß auf mikrosomale Desalkylierungsreaktionen

Während nach PB- und nach PCN-Vorbehandlung eine hochsignifikante Steigerung der Äthylmorphin-N-Demethylase-Aktivität um 90 % nach PB ($p < 0,001$) bzw. um 160 % nach PCN-Gabe ($p < 0,02$) gegenüber den entsprechenden

Tabelle 7: Induktion von mikrosomalen Leberenzymen durch Behandlung von Ratten mit Metyrapon, Phenobarbital und Pregnenolon-16 α -Carbonitril

Gelelektrophoretische Daten

relativer Anteil am Gesamtprotein [%]

	P-450 ^a	K _S ⁱ	K _{MD} ^b	K _{MD} ^c	Biphenyl 2-OH ^d 4-OH ^e	Anilin ^f	A _{MD} ^g	h _{MD} ^h	51 000 d Bande	55 000 d Bande	57 000 d Bande
Kontrolle NaCl (n = 3)	0,89 $\pm$ 0,16	25,8 $\pm$ 4,1	7,19 $\pm$ 0,59	1,67 $\pm$ 0,11	64 $\pm$ 6	1,47 $\pm$ 0,44	1,09 $\pm$ 0,24	235 $\pm$ 47	23,8 $\pm$ 2,3	8,0 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 0,5
Phenobarbital 3 x 80 mg/kg (n = 4 - 5)	1,95 $\pm$ 0,08**	2,3 $\pm$ 0,8*	13,80 $\pm$ 0,60**	4,62 $\pm$ 0,44**	257 $\pm$ 22**	3,19 $\pm$ 0,48	1,86 $\pm$ 0,04**	411 $\pm$ 63	33,3 $\pm$ 2,7*	4,9 $\pm$ 0,4*	7,8 $\pm$ 0,3
Metyrapon 3 x 50 mg/kg (n = 3)	1,21 $\pm$ 0,10	29,2 $\pm$ 1,9	8,94 $\pm$ 0,84	1,93 $\pm$ 0,25	138 $\pm$ 37	1,81 $\pm$ 0,67	1,13 $\pm$ 0,31	426 $\pm$ 130	25,2 $\pm$ 1,9	6,5 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 0,6
3 x 100 mg/kg (n = 3)	1,23 $\pm$ 0,05	16,5 $\pm$ 2,5*	11,11 $\pm$ 0,47*	2,03 $\pm$ 0,22	158 $\pm$ 38	2,01 $\pm$ 0,42	1,15 $\pm$ 0,32	453 $\pm$ 33*	28,5 $\pm$ 2,1	5,6 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,4
Kontrolle Gal. (n = 6)	1,00 $\pm$ 0,05	25,4 $\pm$ 3,8	6,98 $\pm$ 0,65	1,60 $\pm$ 0,31	85 $\pm$ 17	1,82 $\pm$ 0,37	1,08 $\pm$ 0,12	424 $\pm$ 97	23,4 $\pm$ 1,4	6,0 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 0,6
PCN 3 x 100 mg/kg (n = 3)	1,46 $\pm$ 0,20	6,4 $\pm$ 2,7*	18,23 $\pm$ 2,32*	1,98 $\pm$ 0,42	187 $\pm$ 34*	1,87 $\pm$ 0,81	1,63 $\pm$ 0,52	374 $\pm$ 90	30,7 $\pm$ 1,3*	5,9 $\pm$ 0,8	7,2 $\pm$ 0,5

Die Werte sind Mittelwerte $\bar{x} \pm S_x$ (n = Anzahl der unabhängigen Mikrosomenpräparationen); * p < 0,05, ** p < 0,005.

- a Cytochrom P-450-Gehalt (nmol x mg Prot.⁻¹)
b 7-Hydroxy-N-Demethylierung (nmol Formaldehyd x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
c 7-Khydroxycoumarin-O-Deethylierung (nmol 7-Hydroxycoumarin x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
d Biphenyl-2-Hydroxylierung (nmol 2-Hydroxybiphenyl x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
e Biphenyl-4-Hydroxylierung (nmol 4-Hydroxybiphenyl x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
f Anilin-Hydroxylierung (nmol p-Aminophenol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
g Arylhydrocarbon-Hydroxylase-Aktivität (nmol 3-Hydroxy-Benzpyren x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
h Epoxidhydratase-Aktivität (nmol Styroglycol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
i apparente Bindungskonstante für Metyrapon (μ M MP)

Kontrollen auftritt, läßt sich nach Metyrapon-Behandlung nur eine relativ schwache, konzentrationsabhängige Zunahme dieser Enzymaktivität feststellen (Tab. 7). Hier unterscheiden sich nur die als Folge der höheren Metyrapon-Dosierung erreichten Umsatzraten signifikant ($p < 0,001$) von den NaCl-Kontrollwerten ($3 \times 50 \text{ mg MP/kg}$: $8,94 \pm 0,84$; $3 \times 100 \text{ mg MP/kg}$: $11,11 \pm 0,47 \text{ nmol Formaldehyd} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$).

Die O-Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin, die unter der Induktionswirkung von Phenobarbital signifikant um das rund Dreifache ansteigt (NaCl: $1,67 \pm 0,11$; PB: $4,62 \pm 0,44 \text{ nmol 7-Hydroxycoumarin} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), zeigt im Gegensatz zur oben erwähnten Desalkylierungsreaktion der Äthylmorphindemethylierung, weder signifikante Veränderungen nach PCN- noch nach Metyrapon-Behandlung der Ratten. In allen drei Gruppen sind die gemessenen Umsetzungen gegenüber Kontrollen nur schwach erhöht bzw. liegen noch im Kontrollbereich (Tab. 7).

3.9.3. Einfluß auf mikrosomale Hydroxylierungsreaktionen

Bezüglich der Biphenyl-2-Hydroxylase zeigen sowohl PCN als auch Metyrapon in beiden Konzentrationen wiederum einen abgeschwächten PB-artigen Induktionseffekt. Während Phenobarbital-Vorbehandlung die Hydroxylierung des Biphenylmoleküls in Position 2 um das Vierfache ($p < 0,005$) steigert, bewirken die genannten Induktoren nur eine Verdopplung der Umsatzrate. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle liegt auch in der PCN-Gruppe vor ($p < 0,025$).

Obwohl Phenobarbital eine Verdopplung der Biphenyl-4-Hydroxylase-Aktivität bewirkt, wird ähnlich wie bei der 7-Äthoxycoumarin-O-Demethylierung auch die Biphenyl-4-Hydroxylierung weder durch PCN noch durch Metyrapon nennenswert verändert. Zwar kann man in beiden Gruppen eine schwache Tendenz zur Zunahme der Aktivität feststellen, aber die gefundenen Mengen 4-Hydroxy-Metybolite bleiben im Kontrollbereich (Tab. 7).

Auch die Hydroxylierung von Anilin, die als Folge einer Phenobarbital-Behandlung signifikant ($p < 0,005$) um 70 % zunimmt, wird durch Metyrapon nicht beeinflusst. Die nach PCN-Gabe zu beobachtende Tendenz zur Aktivitätszunahme ist wegen hoher Streuung statistisch nicht signifikant (Tab. 7).

Bezüglich der Benzpyren-Hydroxylierung bewirken beide Metyrapon-Dosierungen einen ähnlichen Effekt wie Phenobarbital, indem sie eine knappe Verdopplung der AHH-Aktivität gegenüber der NaCl-Kontrolle bewirken, die jedoch nur im Falle der höheren Metyrapon-Dosierung statistisch gesichert ist ($p < 0,02$). Auch die nach PCN gemessenen Metabolisierungsraten liegen im gleichen Bereich, zeigen aber gegenüber der zugehörigen Gummi arabicum-Kontrolle, die ungewöhnlich hoch ist, keine Veränderung (Tab. 7).

3.9.4. Einfluß auf die Epoxidhydratase-Aktivität

Die Epoxidhydratase wird weder von Phenobarbital noch von einer der beiden anderen Substanzen signifikant beeinflusst, zeigt jedoch nach allen drei Induktoren eine Tendenz zur Aktivitätssteigerung, die nach Phenobarbital am deutlichsten wird (NaCl: $13,8 \pm 0,6$; PB: $23,6 \pm 4,3$ pmol Styrolglycol x mg Protein⁻¹ x min⁻¹).

Die in den drei anderen Mikrosomengruppen gemessenen Aktivitäten liegen etwas niedriger und sind untereinander direkt vergleichbar ($18,2 \pm 2,3$; $19,8 \pm 3,6$ und $18,9 \pm 1,8$ pmol Styrolglycol x mg Protein⁻¹ x min⁻¹ für 3 x 50 bzw. 3 x 100 mg MP/kg und für PCN).

3.9.5. Veränderungen im gelelektrophoretischen Bandenmuster

Bei Betrachtung des Polypeptidbandenmusters der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine dieser Mikrosomengruppen fällt auf, daß neben dem schon erwähnten Anstieg der 51 000 Dalton-Bande als Folge einer PB-Induktion im gleichen Molekulargewichtsbereich auch nach PCN-Vorbehandlung eine Bande deutlich sichtbar hervortritt. Der prozentuale Anteil dieser Bande am Gesamtprotein hat unter dem Einfluß von PCN signifikant ($p < 0,02$) um ein Drittel zugenommen (Ga: $23,4 \pm 1,4$; PCN: $30,1 \pm 1,3$ % vom Gesamtprotein) und erreicht damit ein Induktionsausmaß, das dem von PB fast vergleichbar ist (PB: $33,3 \pm 2,7$ %). Auch nach Metyrapon-Behandlung kann man eine leichte - dosisabhängige - Zunahme der Bande 2 feststellen (Tab. 7).

Wie für Phenobarbital bereits beschrieben, läßt sich auch bei den anderen Gruppen eine - gleichzeitig mit dem Anstieg der Bande 2 einhergehende - Abnahme der 55 000 Dalton-Bande (Bande 3) feststellen. Diese Veränderung manifestiert sich statistisch signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit < 2 % allerdings nur in der Phenobarbital-Gruppe. Eine schwache Tendenz in der gleichen Richtung ist auch bei Bande 4 (57 000 d) zu beobachten.

Eine weitere Veränderung ist in dem als Hämoprotein-region charakterisierten Molekulargewichtsbereich (48 000 - 60 000 Dalton) auffällig: Phenobarbital- und Metyrapon-Behandlung bewirken ein Ansteigen der Bande 1, die der Epoxidhydratase zugeordnet wird (NaCl: $6,3 \pm 0,3$; PB: $9,2 \pm 0,7$; MP - 3 x 50 mg/kg: $7,8 \pm 1,2$ und MP - 3 x 100 mg/kg: $7,8 \pm 0,2$ % vom Gesamtprotein). Im Fall von PB (3 x 80 mg/kg) und der höheren Dosierung von Metyrapon ist die Zunahme dieser Bande gegenüber Kontrollgelen statistisch gesichert ($p < 0,025$ bzw. $p < 0,02$). (Die Bande 1 ist in Tab. 7 nicht aufgeführt.)

3.10. Untersuchung von Äthanol und Rifampicin als Induktoren

Äthanol, nach chronischer Gabe als Induktor für Cytochrom P-450 beschrieben (z.B. Luoma und Vorne, 1976; Kalant et al, 1976), aber noch nicht ausführlich klassifiziert, sollte im Folgenden anhand seines Effekts auf eine Reihe Cytochrom P-450-abhängiger Monooxygenasen genauer klassifiziert werden. Daneben wurde der Einfluß des Tuberkulostatikums Rifampicin, dessen induktive Wirkung auf den Steroid- und Fremdstoffwechsel bei Mäusen (Pessayre und Mazel, 1976) und auch beim Menschen (z.B. Remmer, 1974; Remmer et al., 1973; Bolt et al., 1974) bekannt ist, auf Rattenlebermikrosomen - besonders hinsichtlich der Zusammensetzung der Cytochrom P-450-Population - untersucht.

3.10.1. Einfluß auf spektrale Parameter

Nach 14-tägiger Gabe von Äthanol* war in den Lebermikrosomen der so behandelten Ratten eine Erhöhung des Cytochrom P-450-Gehalts um 40 % gegenüber Kontrollmikrosomen festzustellen (Kontrolle: 1,10; Äthanol: 1,52 bzw. 1,55 nmol/mg Prot.). Das Soret-Maximum des CO-Komplexes lag unverändert bei 450 nm, und die Affinität der reduzierten Mikrosomen für Metyrapon - ausgedrückt als apparente Bindungskonstante (K_S) - entsprach ebenfalls Kontrollwerten (Tab. 8).

* Die tägliche Flüssigkeitsaufnahme war im Behandlungszeitraum in beiden Äthanolgruppen etwa gleich und betrug im Durchschnitt ca. 18 ml 15 % Äthanol (v/v) pro Tier, wobei eine deutliche Steigerung von anfänglich 14 ml auf mehr als 20 ml gegen Ende der Behandlung festgestellt werden konnte. Dies entspricht einer durchschnittlichen Aufnahme von 15 ml oder etwa 12 g Äthanol (absolut) pro kg KG pro Tag.

Tabelle 8: Untersuchung von Äthanol und Rifampicin als Induktoren mikrosomaler Leberenzyme in Ratten

Gelelektrophoretische Daten
relativer Anteil am Gesamtprotein [%]

	P-450 ^a	K _S ^b	K _{IMO} ^c	K _{OD} ^d	Biphenyl 2-OH ^e	Anilin ^f	AHH ^g	EH ^h	51 000 d Bande	55 000 d Bande	57 000 d Bande
Kontrolle (H ₂ O)	1,10	25,3	9,5	1,79	106	1,16	383	13,8	27,5	6,2	8,1
Äthanol ¹	1,52	31,5	10,7	3,48	106	1,52	506	16,1	30,0	5,6	8,9
Äthanol ²	1,55	40,0	9,7	3,08	91	1,40	451	15,1	26,3	6,2	8,0
Kontrolle (HCl)	1,15	33,8	9,4	1,98	105	1,35	389	13,3	27,0	6,9	8,3
3 Tage	0,87	37,6	9,9	1,81	113	n.d.	470	12,9	27,2	6,4	8,5
6 Tage											
Rifampicin	1,23	32,1	11,9	2,10	105	1,32	419	n.d.	22,1	6,5	9,4
3 Tage	0,85	45,5	9,5	1,84	127	n.d.	499	21,9	25,3	6,0	9,3
6 Tage											

Die angegebenen Werte sind Einzelwerte einer Mikrosomenpräparation

- ^a Cytochrom P-450-Gehalt (nmol x mg Prot.⁻¹)
^b apparente Bindungskonstante für Metirapon (µM MP)
^c Äthylmorphin-N-Demethylierung (nmol Formaldehyd x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
^d 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylierung (nmol 7-Hydroxycoumarin x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
^e Biphenyl-2-Hydroxylierung (nmol 2-Hydroxybiphenyl x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
^f Anilin-Hydroxylierung (nmol p-Aninophenol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
^g Arylhydrocarbon-Hydroxylase-Aktivität (nmol 3-Hydroxy-Benzpyren x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)
^h Epoxidhydratase-Aktivität (nmol Styrolylcool x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹)

Wie in der Literatur beschrieben (Pessayre und Mazel, 1976) bewirkte Rifampicin-Behandlung in beiden Versuchsgruppen (3- bzw. 6-tägige Induktorgabe) keine Zunahme des Cytochrom P-450-Gehaltes (Tab. 8), und die Lage des Cytochrom P-450-CO-Komplexes blieb ebenfalls unbeeinflusst. Auch die Affinität der reduzierten Mikrosomen für Metyrapon wurde durch das Pharmakon nicht verändert.

3.10.2. Einfluß auf mikrosomale Monooxygenase-Aktivitäten

Nach der 14-tägigen Behandlung mit Äthanol hat in den Mikrosomen die Aktivität der Anilinhydroxylase um ca. 25 % im Vergleich zu Kontrollen zugenommen. Daneben war eine auffällige Steigerung der Äthoxycoumarin-O-Deäthylierung um fast 100 % zu beobachten (Tab. 8). Auch die AHH zeigt mit PB-ähnlichen Umsatzraten eine leichte Tendenz zur Erhöhung (Kontrolle: 383; Äthanol: 506 bzw. 451 nmol 3-Hydroxy-Benzpyren x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹). Die übrigen Stoffwechselwege blieben durch Äthanol dagegen völlig unbeeinflusst.

In den Rifampicin-behandelten Tieren beider Gruppen blieben alle untersuchten Monooxygenase-Aktivitäten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen weitgehend unbeeinflusst (Tab. 8).

3.10.3. Einfluß auf die Epoxidhydratase-Aktivität

Im Gegensatz zu Äthanol, nach dessen Gabe keine Veränderung der Epoxidhydratase-Aktivität auftritt, ist nach 6-tägiger Rifampicin-Behandlung diese Enzymaktivität stark angestiegen (Kontrolle: 13,3; Rifampicin: 21,9 nmol Styrolglycol x mg Prot.⁻¹ x min⁻¹). Diese Zunahme korreliert mit dem Anstieg einer in der Tabelle

nicht aufgeführten gelelektrophoretischen Bande mit einem Molekulargewicht um 49 000 Dalton (Kontrolle : 4,7 %; Rifampicin : 7,2 % vom Gesamtprotein). Dieses Polypeptid wird der Epoxihydratase zugeordnet (Levin et al., 1978; Sharma et al., 1979).*

3.10.4. Einfluß auf das gelelektrophoretische Bandenmuster

Den oben beschriebenen - als Folge der Äthanolbehandlung auftretenden - spektralen und enzymatischen Veränderungen konnten keine charakteristischen Veränderungen im gelelektrophoretischen Muster der Lebermikrosomenproteine zugeordnet werden: Die prozentualen Anteile der untersuchten Hämoproteinbanden 2, 3 und 4 (51 000, 55 000 und 57 000 Dalton) entsprechen denen von Kontrollmikrosomen (Tab. 8).

Auch das gelelektrophoretische Trennmuster der beiden Rifampicingruppen zeigte - außer dem schon erwähnten leichten Anstieg der Bande 1 - keinen Unterschied zu dem von Kontrollen (Tab. 8).

* Levin et al. (1978) fanden nach Behandlung von Ratten mit 2-Acetylaminofluoren(2-AAF) einen deutlichen Anstieg der Epoxidhydratase-Aktivität und konnten gleichzeitig in SDS-Polyacrylamid-Gelelen die auffällige Zunahme einer mikrosomalen Polypeptidbande mit einem Molekulargewicht von ca. 49 000 Dalton nachweisen. Sharma et al. (1979) beobachteten in 2-AAF-induzierten Rattenlebermikrosomen den Anstieg von zwei Banden mit nur sehr geringen Molekulargewichtsunterschieden (ebenfalls im gleichen Molekulargewichtsbereich wie Levin et al., 1978), die sie anhand eines parallel durchgeführten Gelelektrophorese-Laufs mit einer gereinigten Epoxidhydratase-Präparation als Epoxidhydratase-Polypeptide identifizieren konnten. Zusätzlich wurde der Nachweis erbracht, daß sich diese Banden mittels Hämefärbung nicht darstellen lassen, es sich also vermutlich nicht um Hämoproteine handelt.

4. Diskussion

4.1. Gelelektrophoretische Korrelate der durch Phenobarbital und durch polycyclische Kohlenwasserstoffe induzierbaren Cytochrom P-450-Formen

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Lebermikrosomen zeigen nach Vorbehandlung von Versuchstieren mit verschiedenen Induktoren auffällige Veränderungen in der Molekulargewichtsregion zwischen 48 000 und 60 000 Dalton. Dieser Molekulargewichtsreich ist von verschiedenen Autoren durch Nachweis der an Häm gebundenen Peroxidase-Aktivität als "Hämoproteinzone" identifiziert worden (Haugen et al., 1975; Ryan et al., 1975; Welton et al., 1975). Bell und Hodgson (1977a) konnten in dieser Region in Lebermikrosomen von Mäusen einzelne Häm-positive Banden mit Molekulargewichten von 51 000, 53 500 und 56 000 Dalton gelelektrophoretisch darstellen.

1975 konnten Ryan und Mitarbeiter aus Kaninchenlebermikrosomen eine MC-induzierte, als "Cytochrom P-448" bezeichnete Form von Cytochrom P-450 mit einer Molekulargewichtsuntereinheit von 54 000 Dalton bis zu gelelektrophoretischer Homogenität aufreinigen. Analoge Ergebnisse erzielten 1976 Hashimoto und Imai mit Lebermikrosomen MC-behandelter Ratten. Inzwischen ist jedoch von verschiedenen Arbeitsgruppen (Thomas et al., 1976, 1976a; Boobis et al., 1977; Johnson und Muller-Eberhardt, 1977; Guengerich, 1977, 1978; Warner et al., 1978) gezeigt worden, daß aus Lebern von Tieren, die mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen vorbehandelt wurden, mehr als eine Form von induktorspezifischem Cytochrom P-450 isoliert werden kann. Johnson und Muller-Eberhard (1977) sowie Ryan et al. (1979) konnten nach Herstellung von spezifischen Antikörpern anhand immunochemischer Testmethoden zeigen, daß sich

die gereinigten Cytochrom-Formen in ihren immunologischen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden. Auch die Substratspezifität der nach MC-Induktion isolierten Cytochrom-Spezies ist unterschiedlich, wie aus Untersuchungen von Guengerich (1977) hervorgeht.

In unseren Untersuchungen an Ratten nimmt unter dem Einfluß von MC der prozentuale Anteil einer in nicht induzierten Tieren dominierenden Bande mit einem Molekulargewicht von 51 000 Dalton (Bande 2) deutlich ab, während zwei schwächere Banden mit Molekulargewichten von ca. 55 000 und 57 000 Dalton (Bande 3 und 4) erheblich ansteigen, bis am Ende der Beobachtungszeit (36 h nach der letzten Induktorgabe) alle drei Banden zu etwa gleichen Anteilen vertreten sind (Abb. 1, 2, 3 und 6A). Die Entwicklung der beschriebenen Veränderungen konnte sowohl im Zeitverlauf einer einmaligen Gabe von MC (Abb. 5 und 6A) als auch im Verlauf einer verzögerten Ausprägung des Induktionseffektes nach mehrfacher MC-Gabe in Gegenwart von Cycloheximid beobachtet werden (Abb. 2 und 3). Vergleichbare gelelektrophoretische Veränderungen wurden von Boobis et al. (1977) auch für Lebermikrosomen MC- und β -Naphthoflavon-induzierter Mäuse beschrieben mit dem Hinweis, daß auch Anhaltspunkte für ähnliche Befunde bei Ratten vorliegen. Sharma et al. konnten 1979 nach Vorbehandlung von Ratten mit MC und ähnlichen Induktoren wie z.B. Benzpyren, β -Naphthoflavon und TCDD - die Zunahme zweier gelelektrophoretischer Banden mit Molekulargewichten von 54 000 bzw. 56 000 Dalton bestätigen. Kürzlich wurde auch von McIntosh et al. (1980) die Induktion zweier Proteinuntereinheiten mit den etwas abweichenden Molekulargewichten von 52 500 und 55 000 Dalton bei der Ratte durch MC beschrieben.

Der Anstieg zweier distinkter Banden im gelelektrophoretischen Trennmuster von Lebermikrosomen nach MC-Behandlung spiegelt möglicherweise die Zunahme zweier

verschiedener MC-induzierbarer Cytochrome wider. Diese könnten entweder beide in gleichem Umfang alle in den induzierten Tieren beobachteten spektralen und enzymatischen Induktionseffekte bewirken oder könnten individuell für spezifische Veränderungen spektraler und enzymatischer Eigenschaften der Mikrosomen verantwortlich sein. Die letztgenannte Hypothese scheint sich beim Kaninchen zu bestätigen: Bei ontogenetischen Untersuchungen an dieser Spezies konnten Atlas et al. (1977) in bestimmten Entwicklungsstadien nach Induktion mit MC in Lebermikrosomen den selektiven Anstieg jeweils einer gelelektrophoretischen Polypeptidbande beobachten. Gleichzeitig mit der Induktion dieser Banden, deren Molekulargewichte mit 54 000 und 57 000 Dalton angegeben werden, war die Zunahme spezifischer, MC-induzierbarer Monooxygenase-Aktivitäten festzustellen: Induktion von AHH- und Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität korrelierten gut mit dem Anstieg der zuerst auftretenden 57 000 Dalton-Bande und die Zunahme der N-Acetylarlyamin-(2-Acetylarlyaminofluoren-) N-Hydroxylase-Aktivität konnte der später während der Ontogenese ansteigenden leichteren Bande zugeordnet werden. Gleichzeitig mit der Induktion des letztgenannten Enzyms trat die für den Induktor typische Blauverschiebung des Cytochrom P-450-CO-Komplexes nach 448 nm auf, die zu den früheren Zeitpunkten von den Autoren noch nicht beobachtet werden konnte Boobis et al. (1977) konnten bei 4 - 6 Wochen alten Mäusen zwar ebenfalls den Anstieg von zwei gelelektrophoretischen Banden (mit Molekulargewichten von 54 500 und 55 500 Dalton) als Folge einer BNF-Induktion feststellen, aber eine solche präferentielle Zuordnung der nach Induktion gefundenen Banden zu bestimmten spektralen oder enzymatischen Parametern wie beim Kaninchen war nicht möglich.

Im Hinblick auf die in unseren beiden Versuchsserien zur MC-Induktion (MC + CH- und MC-Einzeldosis-Zeitverläufe) für beide Banden gefundenen engen Korrelationen

mit MC-typischen Veränderungen der mikrosomalen Eigenschaften (wobei allerdings die Bande 3 etwas besser korrelierte), war ebenfalls anzunehmen, daß in den von uns untersuchten adulten Ratten MC-spezifisches Cytochrom P-450-Apoprotein in beiden der nach MC-Behandlung ansteigenden Polypeptidbanden anwesend ist.

In den Mischinduktionsexperimenten war nach simultaner Gabe von MC und PB zu Zeitpunkten, zu denen das Absorptionsmaximum des Cytochrom P-450-CO-Komplexes und die Biphenyl-2-Hydroxylierung bereits eine vollständige MC-spezifische Veränderung zeigten, allerdings nur die Bande 3 prozentual erhöht (Abb. 6C und 7). Eine Zunahme des Anteils der Bande 4 am mikrosomalen Protein schien demzufolge nicht notwendig zu sein, um diese Veränderungen zu bewirken.*)

Befunde an schwangeren Ratten ergaben, daß nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Lebermikrosomen dieser (nicht induzierten) Tiere - im Vergleich zu gleichaltrigen nicht schwangeren Ratten - eine bemerkenswerte Zunahme der 57 000 Dalton-Bande ($\hat{=}$ Bande 4) festzustellen war, ohne daß Anzeichen für die Erhöhung einer MC-typischen Cytochrom P-450-Form und die damit in Zusammenhang stehende Ausbildung spezifischer spektraler und enzymatischer Eigenschaften nachweisbar waren (R.Kahl, pers. Mitteilung). Ryan et al. (1979) können nach Aufreinigung von Cytochrom P-450-Fraktionen aus MC-induzierten Rattenlebermikrosomen - neben einer

*) In einer Zusatzuntersuchung zur Mischinduktion sollte durch Variation sowohl der Applikationsart als auch der Reihenfolge der Verabreichung beider Induktoren geklärt werden, ob derartige Modifikationen einen Einfluß auf die bevorzugte Ausprägung spezifischer Eigenschaften in Richtung des einen oder des anderen Induktors ausüben. In den drei Modifikationsgruppen (PB per os 3 h vor MC i.p.; MC i.p. 3 h vor PB p.o.; MC i.p. und PB p.o. gleichzeitig) waren die Veränderungen aller gemessenen spektralen, enzymatischen und gelelektrophoretischen Parameter direkt vergleichbar. Ein Einfluß der Applikationsart konnte somit ausgeschlossen werden.

auch in PB-Mikrosomen vorhandenen Form des Hämoproteins - nur ein MC-spezifisches Cytochrom P-450 (Cyt. P-450_c $\hat{=}$ "Cyt. P-448") isolieren. Die Untereinheiten dieser gelelektrophoretisch homogenen Fraktion weisen ein Molekulargewicht von 56 000 Dalton auf. Sowohl ein bei 447 nm liegendes Absorptionsmaximum des Cytochrom P-450-CO-Komplexes als auch eine erhöhte Benzpyren-Hydroxylase- (AHH-) Aktivität und eine gesteigerte 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylierungsrate charakterisieren diese Form als MC-typisch. Vermutlich entspricht diese Cytochrom-Spezies unserer Bande 3, deren Molekulargewicht von uns mit 55 000 Dalton bestimmt wurde, denn die Autoren geben auch für die Untereinheit der aus PB-induzierten Mikrosomen isolierten Cytochrom P-450-Form (Cyt. P-450_b) ein um 1 000 Dalton höheres Molekulargewicht an (52 000 d), als sich bei unseren Untersuchungen ergab.

Die angeführten Beobachtungen könnten dahingehend interpretiert werden, daß allein die Zunahme der Bande 3 (55 000 d) die Induktion der MC-spezifischen Cytochrom P-450-Form repräsentiert, die für die spektralen Effekte (Blauverschiebung des CO-Komplexes und Affinitätsverlust für den Liganden Metyrapon) und auch die enzymatischen Veränderungen (Steigerung von AHH und Biphenyl-2-Hydroxylierung) verantwortlich ist, eine vermehrte Anwesenheit von Bande-4-Protein dagegen nicht unbedingt erforderlich zu sein scheint. Es wäre also denkbar, daß die Erhöhung der Bande 4 in MC-induzierten Rattenlebermikrosomen die Induktion eines Proteins anzeigt, das nicht mit Cytochrom P-450 assoziiert ist, eventuell sogar nicht einmal im Zusammenhang mit dem Fremdstoffabbau steht, sondern lediglich als Folgeerscheinung des Induktorstimulus zur gleichen Zeit vermehrt synthetisiert wird.

Da nicht auszuschließen ist, daß die im gelelektrophoretischen Bild sich darstellenden Banden inhomogen sind, d.h. sich aus mehreren verschiedenen Polypeptiden mit gleichem Molekulargewicht zusammensetzen (Warner et al. , 1978), muß darüberhinaus die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß in beiden Banden neben induktorspezifischem Protein auch unspezifisches Protein ansteigt.

Der prozentuale Anteil einer anderen - in Kontrollmikrosomen dominierenden - Bande mit einem Molekulargewicht von 51 000 Dalton (Bande 2) nimmt unter der Einwirkung von MC zugunsten der sich verstärkt ausprägenden Banden 3 (55 000 d) und 4 (57 000 d) deutlich ab (Abb. 3, 5, 6A und 6B). Die daraus abzuleitende und aufgrund anderer Befunde schon früher (Atlas et al., 1975; Haugen et al., 1976) erhobene Vermutung, daß die erhöhte Syntheserate einer bestimmten Cytochrom P-450-Form auf Kosten einer oder mehrerer anderer Formen stattfinden könnte, wurde durch Beobachtungen von Atlas et al. (1977) an Kaninchen erhärtet. McIntosh und Mitarbeiter (1980) finden ebenfalls die von uns beschriebene Abnahme einer 51 000 Dalton-Bande zugunsten des Anstiegs von zwei MC-typischen Banden in Lebermikrosomen von Ratten.

Phenobarbital als ein Induktor gegensätzlichen Typs bewirkt bei Ratten einen erheblichen Anstieg der oben erwähnten, primär dominierenden 51 000 Dalton-Bande, der Bande 2 (z.B. Abb. 5 und 6B).

Auch bei anderen Tierarten ist die Induktion einer gelelektrophoretischen Bande mit ähnlichem Molekulargewicht als Folge einer Behandlung mit Phenobarbital zu beobachten, wobei die Größe der von ihr repräsentierten Proteinuntereinheit von Spezies zu Spezies geringfügig variiert (49 000 bis 52 000 Dalton).

Eine enge Beziehung zwischen der Bande 2 und PB-typischen Parametern fiel in unserer Versuchreihe auf: Während des

Anstiegs dieser Bande war eine Zunahme der - durch PB induzierbaren (Sladek und Mannering, 1966 und 1969; Gijon und Bickel, 1971) - Äthylmorphin-N-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Affinität der reduzierten Mikrosomen für Metyrapon festzustellen (Abb. 6B, 7B und 7D).

Ein in diesem Zusammenhang interessanter Befund ging aus den Mischinduktionsexperimenten hervor: Hier stand das Verhalten der vorliegenden Cytochrom P-450-Population gegenüber dem Liganden Metyrapon in völligem Gegensatz zu den bei den übrigen Parametern stattfindenden, deutlich MC-artigen Veränderungen. Nach simultaner Gabe der beiden konträren Induktoren MC und PB war nämlich eine reine PB-artige Affinitätszunahme, d.h. eine starke Erniedrigung der apparenten Bindungskonstante (K_S) für den Liganden zu beobachten (Abb. 7B). Offensichtlich müssen demzufolge hochaffine Bindungsstellen für Metyrapon entstanden sein, ohne daß dies in einer auffälligen prozentualen Zunahme der PB-typischen Bande 2 in den Gelen zum Ausdruck kommt (Abb. 6C). Allerdings findet unter den Bedingungen der Mischinduktion auch nicht - wie nach reiner MC-Induktion - eine Abnahme der Bande 2 statt, sondern die 51 000 Dalton-Bande bleibt im Wesentlichen unverändert (vergl. Abb. 6A und 6C).

Ein anderer Weg, um Korrelationen zwischen den beiden durch polycyclische Kohlenwasserstoffe induzierten gelelektrophoretischen Banden und den typischen spektralen und enzymatischen Veränderungen zu prüfen, ergab sich bei ontogenetischen Untersuchungen im Zusammenhang mit dem cytosolischen Rezeptor für Cytochrom P-448-Induktoren. Diese Studien wurden an vier Nagerspezies durchgeführt. Dabei konnten die oben erwähnten gelelektrophoretischen Befunde bezüglich der selektiven Induzierbarkeit bestimmter induktorspezifischer Banden beim Kaninchen (Atlas et al., 1977) als Folge einer Vorbe-

handlung mit β -Naphthoflavon (BNF) bestätigt werden (Abb. 14). Auch eine Zuordnung der AHH zu einer schon kurz vor dem Geburtstermin auftretenden 57 000 Dalton-Bande konnte vorgenommen werden (vergl. Abb. 10 und 14), und die Induzierbarkeit einer zweiten mikrosomalen Monooxygenase, der Acetanilid-4-Hydroxylase (ACh), war gleichzeitig mit dem Anstieg einer 54 000 Dalton-Bande festzustellen (das entsprechende Gel ist nicht abgebildet).

Über eine solche zeitlich differenzierte Induzierbarkeit bestimmter gelelektrophoretischer Proteinbanden in Lebermikrosomen und spezifische Zuordnung induktortypischer mikrosomaler Eigenschaften wurde auch bei Ratten und Mäusen nach Gabe des hochwirksamen Karzinogens TCDD berichtet (Guenthner und Nebert, 1978). Die genannten Autoren, die ihre ontogenetischen Untersuchungen auf Lebern fetaler und neonater Tiere konzentrierten, konnten nach TCDD-Induktion die Korrelation einer gelelektrophoretischen Bande mit dem Molekulargewicht von 56 000 Dalton mit der Ausprägung der AHH-Aktivität feststellen und fanden einen parallelen Verlauf der Ausbildung einer 54 000 Dalton-Bande und der Induzierbarkeit der Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivität (ACh) bei gleichzeitiger Verschiebung des Soret-Maximums zu kleineren Wellenlängen hin (die genannten Banden dürften den von uns in erwachsenen Ratten nach MC-Behandlung gefundenen Banden 3 und 4 entsprechen). In den eigenen Untersuchungen mit dem Induktor BNF war in Lebermikrosomen fetaler und neugeborener Ratten nach gelelektrophoretischer Auftrennung eine Bande von etwa 56000 Dalton induziert (Abb. 14 und 14a), während bei 7 Tage alten und älteren Tieren zwei Polypeptidbanden deutlich zugenommen haben: Neben der schon zu frühen Zeitpunkten induzierbaren 56000 d-Bande ($\approx$ 57000 d-Bande nach MC) kann die verstärkte Ausprägung einer leichteren Bande von 55000 d beobachtet werden (Abb. 14, 14a).

und Abb.1, 2 und 5).*) Diese Befunde deuten eine Zuordnung der bereits kurz vor der Geburt auftretenden 56000 d-Bande zur AHH-Aktivität an (die ebenfalls zum Geburts-termin maximal induzierbar ist) und lassen einen Zusammenhang der später auftretenden ca. 55000 d-Bande mit der AcH-Aktivität (deren Induzierbarkeit eine Woche nach der Geburt ein Maximum zeigt) erkennen. Eine Korrelation der induktortypischen Blauverschiebung des Cytochrom P-450-CO-Komplexes mit speziell einer der beiden Polypeptidbanden und/oder einer der beiden Monooxygenaseaktivitäten wie sie von Guenthner und Nebert (1978) für Lebermikrosomen TCDD-behandelter neonater Ratten beschrieben wurde, war allerdings nicht möglich, denn diese spektrale Veränderung konnte in den eigenen Untersuchungen (nach BNF-Gabe) schon zum frühesten Untersuchungszeitpunkt in den fetalen Lebern beobachtet werden (vergl. Abb. 8).

Die gefundene ontogenetische Ausprägung von induzierbarer und Kontrollaktivität der AHH in B_6 -Mäusen (Abb. 9) ist vergleichbar mit früheren Befunden Nebert et al. (1972). Eine spezifische Zuordnung der einzelnen Enzymaktivitäten oder der spektralen Veränderung zu gelelektrophoretisch nachweisbaren, induktorspezifischen Proteinuntereinheiten konnte allerdings bei der Maus nicht vorgenommen werden: Zum einen ist auch bei dieser Spezies bereits in fetalen Lebern eine Blauverschiebung des Cytochrom P-450-CO-Komplexes nachweisbar; zum anderen ist schon bei neugeborenen BNF-behandelten Mäusen sowohl eine leichte Zunahme von zwei mikrosomalen Banden mit nur geringen Molekulargewichtsunterschieden zwischen 54000 und 55000 d (das entsprechende Gel ist nicht abgebildet) als auch eine Induzierbarkeit beider Monooxygenasen zu beobachten. Die zum Zeitpunkt der

*) An dieser Stelle muß auf die relative Ungenauigkeit der Molekulargewichtsbestimmung in SDS-Polyacrylamidgelen hingewiesen werden: Weber und Osborne (1969) geben für den Molekulargewichtsbereich zwischen 30 000 und 60 000 Dalton (in 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen) Abweichungen von mehr als 1-2 % des Molekulargewichts an, also etwa ± 1000 Dalton.

Geringfügige Veränderungen der Parameter im System haben außerdem einen starken Effekt auf die Molekulargewichtsbestimmung (Bell und Hodgson, 1977).

Hierauf lassen sich die leicht voneinander abweichenden Molekulargewichtsangaben verschiedener Autoren zurückführen.

Geburt stärkere Zunahme der AHH-Aktivität gegenüber Kontrollen läßt auf ein früheres Einsetzen der AHH-Induzierbarkeit schließen, obwohl maximale Induktionseffekte zu fast gleichen Zeitpunkten wenige Tage nach der Geburt erreicht werden. Auch Boobis et al. (1977), die nach MC- und BNF-Induktion in Lebermikrosomen von adulten Mäusen zwei Banden mit Molekulargewichten von 54 500 und 55 500 Dalton nachweisen konnten, ließen die Frage nach der präferentiellen Zuordnung einer der Banden zu bestimmten spektralen und/oder enzymatischen Parametern offen. Shut und Thorgeirsson (1978) konnten in der Leber von adulten Sigmodon hispidus keine Induzierbarkeit der AHH-Aktivität feststellen, was in der vorliegenden Studie allerdings nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise spielen hierbei Geschlechtsunterschiede eine Rolle; die Tiere, in denen wir die starke Induktion der AHH feststellten (26 und 68 Tage alt), waren Weibchen (Abb. 11), die genannten Autoren verwendeten dagegen männliche Tiere für ihre Untersuchungen. Unseres Wissens sind Geschlechtsunterschiede im Pharmakon-Abbau bei dieser Tierart nicht genauer untersucht worden. Eine differentielle Korrelation einzelner Induktionsparameter mit bestimmten gelelektrophoretischen Banden war auch bei dieser Spezies nicht durchzuführen.

Eine klare Zuordnung der beiden untersuchten Monooxygenase-Aktivitäten, AHH und AcH, zu zwei gelelektrophoretisch unterscheidbaren Cytochromen P-450 war nur beim Kaninchen und bei der Ratte möglich. Verschiedene Befunde weisen darauf hin, daß diese beiden Enzymaktivitäten auch bei der Maus zeitlich unterschiedlich reguliert werden. Die Tatsache, daß die AHH-Aktivität in neonaten Ratten (Abb. 8) und Mäusen (Abb. 9) zwei bis drei Tage früher induzierbar ist als die der AcH, bestätigt Ergebnisse von Guenther und Nebert (1978), und der Befund, daß zwischen der Induzierbarkeit dieser beiden Enzymaktivitäten beim Kaninchen eine zeitliche Differenz von zwei bis drei Wochen liegt (Abb. 10),

gleicht dem von Atlas et al. (1977) beschriebenen ontogenetischen Unterschied in der Induzierbarkeit der AHH und einer anderen mikrosomalen Hydroxylase-Aktivität, der N-Acetylarlyamin- (2-Acetylaminofluoren-) N-Hydroxylase, in dieser Tierspezies. Allerdings ist - im Gegensatz zur genannten N-Hydroxylase, die beginnend 10 Tage nach der Geburt in allen Altersstufen induzierbar bleibt - in der Leber von Kaninchen, die älter als 4 - 5 Wochen sind, eine induktive Steigerung der ACH-Aktivität durch BNF-Vorbehandlung nicht mehr zu erreichen. Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß die Form von Cytochrom P-450, mit der die induzierte ACH-Aktivität in Zusammenhang steht, nicht mit der für die N-Acetylarlyamin-N-Hydroxylase-Aktivität verantwortlichen Form des Cytochroms identisch ist. Darüberhinaus ist nochmals zu betonen, daß auch Cytochrom P₁-450, per definitionem die Form, mit der die induzierbare AHH-Aktivität assoziiert ist, eine eigene, von den beiden postulierten Formen zu unterscheidende Subspezies repräsentiert.

Ebensowenig wie eine deutliche Korrelation mit bestimmten gelelektrophoretisch abgetrennten Polypeptid-untereinheiten ließ sich in unserer ontogenetischen Studie eine Korrelation der beiden Enzymaktivitäten mit spektralen Charakteristika der Cytochrome sichern. Im Gegensatz zu Guenthner und Nebert (1978), die über einen parallelen Verlauf der Ontogenese von ACH-Aktivität und Blauverschiebung des Soret-Maximums in der Leber TCDD-induzierter neonater Ratten und Mäuse berichten, konnte eine derartige Zuordnung in der vorliegenden Untersuchungsreihe nach BNF-Induktion weder bei den genannten Tierarten, noch bei Kaninchen oder *S. hispidus* vorgenommen werden. Demzufolge war auch eine Charakterisierung der gleichzeitig mit dem spektralen und dem enzymatischen Induktionseffekt verstärkt auftretenden gelelektrophoretischen Bande mit einem

Molekulargewicht von ca. 54 000 Dalton als "Cytochrom P-448-Untereinheit" wie die genannten Autoren sie vornehmen nicht möglich, obwohl eine einzelne Proteinbande mit vergleichbarem Molekulargewicht in neugeborenen Ratten und Mäusen auch nach BNF-Vorbehandlung stark induziert war.

Obwohl auch neueste immochemische Testergebnisse mit Cytochrom P-450-Fraktionen aus Lebermikrosomen MC-behandelter Mäuse (Negishi und Nebert, 1979) als Hinweis für eine enge Korrelation zwischen induzierbarer ACh-Aktivität und Cytochrom P-448 interpretiert wurden, deuten die in der vorliegenden Entwicklungsstudie erhaltenen Daten darauf hin, daß durch BNF induzierbare ACh-Aktivität und Cytochrom P-448 durchaus unterschiedlich sein könnten. Derartige Beobachtungen unterstützen die Hypothese (Nebert, 1979), daß eine sehr große Zahl von P-450-Formen existiert und daß der Ah-Locus - von dem noch vor einigen Jahren angenommen wurde, daß er eine einzige, durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe induzierbare Form von Cytochrom P-450 kontrolliert (Nebert et al., 1971) - die Induktion einer Vielzahl von Cytochrom P-450-Formen regulieren kann.

Wie im Ergebnisteil kurz erwähnt, repräsentieren die Kontrollaktivitäten von AHH und ACh Reaktionen, an denen sehr wahrscheinlich bereits mehrere Formen von Kontroll-Cytochrom P-450 beteiligt sind, die nicht durch den Ah-Locus reguliert werden (Nebert und Jensen, 1979), denn Kontrollaktivitäten sowohl der AHH als auch der ACh werden durch Einsatz von α -Naphthoflavin als Inhibitor bei in vitro-Untersuchungen beide um mehrere Größenordnungen schwächer gehemmt als die BNF-induzierten Aktivitäten. Die BNF-induzierten Formen dieser Enzyme scheinen die Substrate Benzpyren bzw. Acetanilid spezifischer als die entsprechenden Kontrollaktivitäten

zu metabolisieren, denn sie besitzen niedrigere K_M -Werte (Negishi und Nebert, 1979).

4.2. Ontogenese des TCDD-Rezeptors

Aus den gezeigten Daten der ontogenetischen Untersuchungsreihe geht hervor, daß spezifische Bindungsstellen für TCDD in den Lebern der vier untersuchten Tierspezies bereits in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft nachweisbar sind und daß - obwohl gewisse speziesspezifische Unterschiede im Verlauf der Entwicklung festgestellt wurden - in der Zeitspanne zwischen Geburt und dem Alter von 3 - 4 Wochen die Konzentration dieser Bindungsstellen ein Maximum erreicht, anschließend wieder abnimmt und in erwachsenen Tieren demgegenüber deutlich erniedrigt ist (Abb.8-11).

Generell kann daher festgehalten werden, daß die relativen Konzentrationen des cytosolischen TCDD-Rezeptors in der Leber im allgemeinen einen ähnlichen Verlauf zeigen wie die Induzierbarkeit zahlreicher mikrosomaler Monooxygenase-Aktivitäten - in der vorliegenden Studie demonstriert am Beispiel der AHH und der AcH (Abb. 8 - 11), die ebenfalls im gleichen weit gefaßten Entwicklungszeitraum zwischen Geburt und Entwöhnung eine auffällige Steigerung erfährt und im älteren Tier wieder abnimmt. Die bezüglich der Enzymaktivitäten erwähnten Befunde bestätigen die in der Literatur für Ratten, Mäuse und andere Versuchstiere beschriebenen Beobachtungen. Eine Übersicht darüber geben Guenther und Mannering (1977). Weiter oben ist dargestellt worden, daß bei genauer Betrachtung der Ontogenie-Daten die beiden untersuchten Monooxygenase-Aktivitäten unterschiedliche Entwicklungsmuster aufweisen. Diese Beobachtung macht deutlich, daß das Vorhandensein von TCDD-spezifischen Bindungsstellen

im Cytosol nicht automatisch auch die Induzierbarkeit aller assoziierten Enzymaktivitäten zur Folge haben muß.

Ein vergleichbares Phänomen ist für cytosolische Glucocorticoid-Rezeptoren im Intestinum junger Ratten beschrieben worden (Henning et al., 1975); auch hier ist allein aus der Anwesenheit von Rezeptor noch keine Voraussage über das Ausmaß - als Folge einer Glucocorticoid-Behandlung - auftretender Enzyminduktionen möglich.

Aus den Zeitverlaufkurven der in den verschiedenen Altersstufen gemessenen Enzymaktivitäten geht hervor, daß die Induzierbarkeit dieser Monooxygenasen einer zeitlichen Kontrolle unterliegen muß, die in engem Zusammenhang mit dem Ah-Locus steht - eine Forderung, die schon von anderen Autoren aufgrund von Untersuchungen an Kaninchen (Atlas et al., 1977) und an Ratten und Mäusen (Guenthner et al., 1978) aufgestellt wurde. Ob dieser Kontrollmechanismus vergleichbar ist mit sog. "temporal genes" wie sie für eine Reihe von Enzymen und für Membranantigene in der Maus (Paigen, 1961; Chapman et al., 1973; Lusi et al., 1975 und Boubelik et al., 1975), für Esterase in Zea mays (Schwartz, 1962) und für Aldehyd-Oxidase und α -Amylase in Drosophila (Dickinson, 1975; Paigen, 1977) eingehend untersucht und beschrieben sind, muß noch offen bleiben. Es könnte entweder eine direkte Beeinflussung der Expression von Strukturgenen erfolgen, oder es könnte über die Ausbildung von verschiedenen Regulatorgenprodukten ein Einfluß ausgeübt werden. Der erste Fall stünde mit der von Nebert und Jensen (1979) aufgestellten Hypothese im Einklang, daß eine einzige Rezeptorspezies das Hauptprodukt eines Regulatorgens darstellt, unter dessen Kontrolle die Ausprägung zahlreicher Strukturgene steht; im letzteren Fall wäre dagegen das Vorhandensein von mehreren mit dem Ah-Locus assoziierten Rezeptoren zu fordern.

Die Daten in unserer Untersuchungsserie zeigen keine sehr engen Korrelationen zwischen gemessenem Rezeptorgehalt und dem Ausmaß der Induzierbarkeit von AHH und Ach. Möglicherweise wird der jeweilige spezifische Rezeptor für die Induktion dieser Enzymaktivitäten nur von einem kleinen Teil des im Saccharose-Dichtegradienten gefundenen Peaks spezifischer TCDD-Bindung repräsentiert. Der Rest der TCDD-Bindung könnte entweder unterschiedliche Rezeptorpopulationen darstellen, die jeweils unterschiedliche Formen von induzierbarem Cytochrom P-450 und die damit verbundenen Monooxygenase-Aktivitäten kontrollieren oder könnten mit anderen Proteinen mit hoher Affinität für TCDD zusammenhängen.

Befunde aus Untersuchungen mit Fibroblasten (Gehly et al., 1979) und Hepatoma-Zellkulturen der Maus (I.S. Owens und D.W. Nebert, unveröffentlichte Ergebnisse), die zeigten, daß einzelne Mutantenclone dieser Zellen die Induzierbarkeit der AHH durch einen bestimmten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoff (z.B. MC) verloren haben, mit einem anderen (z.B. Benzantracen) aber weiterhin induzierbar sind, würden die Hypothese von der Existenz mehrerer Rezeptoren unterstützen. Hinweise auf Heterogenität liegen auch für andere Rezeptoren vor, wie z.B. für Oestrogen-bindende Proteine (Clark et al., 1978; Puca et al., 1971), für Glucocorticoid-bindende Proteine (Beato und Feigelson, 1972; Koblinsky et al., 1972; Lippman et al., 1973; Ginnopoulos, 1975) und für Benzodiazepin-Bindungsstellen (Karbath et al., 1979).

4.3. Induktionsmuster nach Behandlung mit alternativen Induktoren

Das Antimykotikum Clotrimazol, das klinisch bei der Behandlung einer großen Anzahl von Pilzinfektionen Anwendung findet, wird wegen verschiedener unerwünschter Wirkungen - wie z.B. intestinale Störungen bei ca. 10% der Patienten und Erhöhung der Serumspiegel bestimmter Leberenzyme (Plömpel, 1976) - meist nicht systemisch verabreicht.

Bei Ratten und Hunden hatte eine Langzeitbehandlung mit Clotrimazol einen isolierten Anstieg der alkalischen Phosphatase zur Folge (Tettenborn, 1970). Außerdem konnte Tettenborn (1972) nach chronischer Gabe von Clotrimazol (13 Wochen bis zu 200 mg/kg KG) bei den genannten Tierspezies dosisabhängige Vergrößerungen der Leber und bei Ratten auch degenerative Veränderungen der Hepatocyten feststellen. Die vermutete Induktion mikrosomaler Enzyme durch das Antimykotikum konnte anhand von in vivo-Untersuchungen an Mäusen (Dauer von Hexobarbital-Schlafzeit und Zoxazolamin-Paralyse) und mittels in vitro-Tests mit Rattenlebermikrosomen (Entgiftung von Parathion und O-Demethylierung von p-Nitroanisol) bestätigt werden (Tettenborn, 1970). Clotrimazol erwies sich dabei als ein wirkungsvoller Induktor, der in den erwähnten Untersuchungen einen ähnlichen Effekt wie Phenobarbital hervorrief. Sowohl die gefundenen induktiven Veränderungen in der Leber als auch Hypertrophie des Organs waren - auch nach längerer chronischer Applikation von Clotrimazol - innerhalb einer Rekonvaleszenzzeit von ca. zwei Wochen vollständig reversibel (Tettenborn, 1970 und 1972).

Auch beim Menschen ist eine durch das Antimykotikum nach längerer Behandlung (> 21 - 28 Tage) ausgelöste und

seinen eigenen Abbau beschleunigende - reversible - Induktion mikrosomaler Leberenzyme bekannt geworden (Plempel, 1976).

In den eigenen Untersuchungen konnte bei Ratten eine Vergrößerung der Leber schon nach nur dreimaliger oraler Gabe von 50 bzw. 100 mg Clotrimazol pro kg KG beobachtet werden; Verabreichung der Clotrimazol-Analoga bewirkte ebenfalls eine Erhöhung des Lebergewichts. Eine Clotrimazol-Behandlung mit 3×50 mg/kg verursachte bei den Versuchstieren einen statistisch signifikanten Anstieg des Cytochrom P-450-Gehaltes, der Äthylmorphin-N-Demethylierung, der Äthoxycoumarin-O-Deäthylierung und der Biphenyl-2-Hydroxylierung (Tab. 5). Biphenyl-4-Hydroxylierung, Anilin-Hydroxylierung, AHH-Aktivität und Epoxidhydratase-Aktivität zeigten eine leichte, aber statistisch nicht signifikante Erhöhung. Der prozentuale Anteil der PB-induzierbaren Bande mit dem Molekulargewicht von 51 000 Dalton hatte ebenfalls zugenommen. Anhand des beschriebenen Induktionsmusters (Tab. 5) kann Clotrimazol als PB-ähnlicher Induktor charakterisiert werden. Für eine solche Klassifizierung sprechen auch Befunde (R. Kahl et al., 1980), daß Clotrimazol-induzierte Äthoxycoumarin-O-Deäthylierung durch Metyrapon, einen Inhibitor PB-induzierter Monooxygenasen (Goujon et al., 1972), fast vollständig gehemmt wird und durch 7,8-Benzoflavon, eine Substanz, durch die MC-induzierte Monooxygenasen hemmbar sind (Wiebel et al., 1971; Goujon et al., 1972), eine leichte Steigerung erfährt.

Interessant ist jedoch, daß bei Erhöhung der Dosis von 3×50 auf 3×100 mg/kg KG - obwohl der Cytochrom P-450-Gehalt stark angestiegen ist und der prozentuale Anteil der 51 000 Dalton-Bande sogar höher ist als nach PB-Induktion - die Zunahmen der Enzymaktivitäten weniger deutlich ausgeprägt sind oder sogar ganz fehlen. Dieser

Befund könnte zu der Vermutung Anlaß geben, daß Clotrimazol, das bei in vitro-Untersuchungen mikrosomaler Enzymaktivitäten (R. Kahl et al., 1980) als stark wirksamer Inhibitor verschiedener Monooxygenase-Aktivitäten aufgefallen war, nach der hohen in vivo-Dosierung noch in den Lebern der induzierten Tiere anwesend war und möglicherweise für das Fehlen einer dosisabhängigen Steigerung der untersuchten Hydroxylierungs- und Desalkylierungsreaktionen verantwortlich zu machen ist. Durch Zugabe von Hitze-inaktivierten Lebermikrosomen solcher hochdosierten Tiere konnte in Kontrollmikrosomen allerdings keine Hemmung der Monooxygenase-Aktivität erzielt werden. Es war also kein Hinweis für nennenswerte Clotrimazol-Restkonzentrationen gegeben, mit denen die niedrige Enzymaktivität erklärt werden könnte; allerdings wurde im Rahmen der beschriebenen Versuche ein Nachweis für Clotrimazol auf chemischem Wege nicht unternommen. Es ist demnach nicht auszuschließen, daß eine gewisse Menge des Imidazolderivats an Cytochrom P-450 gebunden vorliegt, dieses blockiert und so einen weiteren Anstieg der P-450-abhängigen Monooxygenasen verhindert. Andererseits kann der Effekt auch als Hinweis auf eine Schädigung der Leberfunktion durch die hohe Clotrimazol-Dosis gewertet werden (vergl. Tettenborn, 1970).

Nicht nur Clotrimazol, sondern auch die übrigen drei fungistatischen Imidazolderivate (Clotrimazol-Analoga) sind in vitro wirksame - aber im Vergleich zu Clotrimazol etwas schwächere - Inhibitoren von Monooxygenase-Aktivitäten, wobei interessanterweise der Induktionsstatus der Mikrosomen nur eine geringe Rolle spielt.

Was die Induktionswirkung der drei untersuchten Clotrimazol-Analoga betrifft, so zeigen sie einen im wesentlichen ähnlichen, aber schwächeren induktiven Effekt als Clotrimazol selbst. Bei allen diesen Substanzen

konnte (im Gegensatz zu Clotrimazol) - bei Erhöhung der applizierten Menge von 3 x 50 auf 3 x 100 mg/kg KG - eine dosisabhängige Steigerung des Induktionseffektes festgestellt werden, was möglicherweise mit der bei gleicher Dosierung schwächeren inhibitorischen Wirkung dieser Antimykotika im Zusammenhang gesehen werden kann.

Eine Besonderheit wies das Induktionsmuster von BAY f 8751 auf: die Substanz bewirkte schon in der niedrigen Dosierung eine deutliche Steigerung der Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität wie sie auch nach polycyclischen Kohlenwasserstoffen beobachtet wird, ohne daß ein entsprechend hoher Gehalt an Cytochrom P-448 gemessen wurde.

Da mit der fluorimetrischen Nachweismethode nicht zwischen einer Hydroxylierung des Biphenylmoleküls in Position 2 oder 3 differenziert werden kann, beruht die Zunahme der gemessenen Fluoreszenzäquivalente möglicherweise zum Teil auf einer Bildung des 3-Hydroxy-Metaboliten - einem Abbauweg, der durch PB induzierbar ist (Billings und McMahon, 1978). Da nämlich für MC-spezifische Veränderungen nach Gabe von BAY f 8751 sonst keinerlei Anzeichen vorliegen, ist es relativ unwahrscheinlich, daß es sich hier um eine Steigerung der Cytochrom P-448-abhängigen 2-Hydroxylierung handelt.

Die als Folge einer Behandlung mit BAY g 7155 oder BAY l 9139 auftretenden Induktionseffekte sind weniger stark ausgeprägt, rein qualitativ aber den Veränderungen, die nach PB-Gabe auftreten, sehr ähnlich - allerdings mit der Einschränkung, daß nach BAY l 9139 weder eine Zunahme der 51 000 dalton-Bande noch eine Steigerung der Epoxidhydratase-Aktivität beobachtet wurde.

Zusammenfassend läßt sich konstatieren, daß nach in vivo-Gabe aller getesteten fungistatischen Imidazole eine Induktion des mikrosomalen Cytochrom-P-450-Gehaltes

sowie verschiedener Monooxygenase-Aktivitäten und der Epoxidhydratase-Aktivität in der Rattenleber zu beobachten war. Die schwächere Induktionswirkung der Clotrimazol-Analoga könnte sich dabei als Vorteil bei der klinischen Anwendung erweisen, falls die systemische Verabreichung eines Antimykotikums indiziert ist und auch die anderen Parameter eine solche Applikationsart zulassen.

Während der Behandlung mit Clotrimazol über einen längeren Zeitraum muß sowohl mit einer Hemmung als auch mit Induktion von Monooxygenase-Aktivitäten gerechnet werden. Der Einfluß eines derartigen Zusammenspiels auf den Metabolismus von Pharmaka und Karzinogenen ist in vivo bisher noch nicht genauer untersucht worden; theoretisch sind bei systemischer Anwendung dieses Antimykotikums eine Reihe auffälliger Stoffwechselinteraktionen zu erwarten. Andererseits dürften sich bei lokaler Applikation von Clotrimazol, wie es allgemein praktiziert wird, Konsequenzen für den Metabolismus von Karzinogenen in Haut und Schleimhaut ergeben. In vitro konnte nämlich die Bildung von Kohlenwasserstoff-Metaboliten, die sich als ultimate Karzinogene kovalent an die DNA binden, durch Zugabe von Clotrimazol schon in mikromolaren Konzentrationen vollständig unterdrückt werden (R. Kahl et al., 1980). Aus diesem Grund wäre z.B. eine Untersuchung, ob Clotrimazol in einem Karzinogenitätstest an der Haut von Mäusen eventuell die Entstehung von Tumoren verhindern kann von großem Interesse. In diesem Zusammenhang bliebe auch noch der Einfluß von Clotrimazol auf Monooxygenasen in der Haut unterschiedlich vorbehandelter Tiere zu prüfen.

Da für Metyrapon (MP) an der isoliert perfundierten Leber ein atemdepressiver Effekt beschrieben wurde (Kahl und Simon, 1971), wurde die Dosierung dieses Induktors in einen relativ niedrigen Konzentrationsbereich gelegt, bei dem unter Zugrundelegung des semi-in vivo-Modells die Atmung nicht entscheidend beeinträchtigt wurde. Kritisch war in diesem Zusammenhang, ob die verabreichte geringe Dosis, angesichts der bei Ratten nur kurzen Plasma-Halbwertszeit von MP, die je nach Tageszeit zwischen ca. 10 und 20 min schwankt (Szeberényi et al., 1969), für das Erzielen einer Induktionswirkung ausreichend sein würde.

Wie die Ergebnisse zeigen (Tab. 7), provoziert MP-Behandlung in den verwendeten Dosierungen bei Ratten in der Tat induktive Veränderungen in den Lebermikrosomen, die in den meisten Fällen eine Tendenz zur Dosisabhängigkeit erkennen lassen. Der gefundene Induktionseffekt ist in Anbetracht der kurzen Halbwertszeit der Ausgangssubstanz möglicherweise zu einem entscheidenden Anteil auf die Aktivität des durch reduktiven Abbau entstehenden Hauptmetaboliten von MP (Kraulis et al., 1968; Kahl und Netter, 1970) zurückzuführen, dessen inhibitorische Eigenschaften auf den oxidativen Fremdstoffwechsel nur wenig hinter denen der oxidativen Ausgangssubstanz zurückbleiben.

Neben einer Erhöhung des Cytochrom P-450-Gehalts konnten besonders auffällige Steigerungen der PB-induzierbaren Äthylmorphin-N-Demethylierung und der Biphenyl-2-Hydroxylierung festgestellt werden (Tab. 7). Die Verdopplung der BP-Hydroxylierungsrate und der Anstieg der Epoxidhydratase-Aktivität waren direkt mit PB-Werten vergleichbar.

PB-artige Induktionswirkungen von Metyrapon sind auch in der Literatur beschrieben: So konnten Feuer et al. (1971) in Leberhomogenaten von Ratten gesteigerte

Aktivitäten der Hexobarbital-Oxidase und der Coumarin-3-Hydroxylase messen. Bergmann et al. (1979) wiesen eine erhöhte Metabolisierungsrate von Äthylmorphin im Leberhomogenat von Ratten nach, die 4 Tage lang mit MP behandelt worden waren; gleichzeitig war bei diesen Tieren eine signifikante Verkürzung der Hexobarbital-Schlafzeit zu beobachten. Nur bei akuter MP-Gabe trat in der Studie von Bergmann et al. (1979) die inhibitorische Wirkung von MP in den Vordergrund und verursachte eine Hemmung der N-Demethylase-Aktivität sowie eine Verlängerung des Narkoseeffektes von Hexobarbital. Veränderungen wie nach PB-Induktion wurden in den eigenen Untersuchungen auch durch eine Erniedrigung der apparenten Bindungskonstante für MP, den Induktor selbst, offensichtlich; die Affinitätszunahme erreicht allerdings bei weitem nicht das Ausmaß wie nach PB-Induktion. Die in den Gelen zu beobachtende schwache prozentuale Zunahme der PB-induzierbaren Bande (51 000 d) deutet ebenfalls einen PB-artigen Induktionseffekt an.

Die genannten Befunde weisen - in Übereinstimmung mit enzymatischen Untersuchungen in der Literatur - MP als einen schwachen Induktor eines Cytochrom P-450 vom PB-Typ aus (Tab. 7), an das MP auch präferentiell bindet und das es präferentiell hemmt.

Im Gegensatz zu den distinkten gelelektrophoretisch sich darstellenden Unterschieden zwischen Lebermikrosomen Pregnenolon-16 α -Carbonitril- (PCN-) und PB-behandelter Mäuse, die in der spezifischen Induktion von Banden mit Molekulargewichten von 54 000 d (nach PCN) bzw. 51 000 d (nach PB) zum Ausdruck kommen (Haugen et al., 1976), war in den eigenen Untersuchungen bei Ratten eine deutliche Unterscheidung zwischen dem mikrosomalen Proteintrennmuster nach PCN-Induktion und dem nach PB-Vorbehandlung nicht möglich: In beiden Mikrosomengruppen konnte eine

fast gleich große, signifikante Zunahme einer Polypeptidbande von 51 000 d (Bande 2) beobachtet werden (Tab. 7). Auch Sharma et al. (1979) fanden in Lebermikrosomen PCN-vorbehandelter Ratten nach gelelektrophoretischer Auftrennung ein Polypeptid mit einem der PB-Bande vergleichbaren Molekulargewicht von ca. 51 000 d induziert. Der Befund, daß die Front dieser relativ breiten Bande stets eine etwas längere Laufstrecke aufwies als die Front der PB-induzierten Bande, ließ die Autoren vermuten, daß dieses Phänomen möglicherweise auf die Induktion von zwei Polypeptiden in diesem Bereich nach PCN-Gabe zurückzuführen ist, die sich aber wegen zu geringer Unterschiede im Molekulargewicht gelelektrophoretisch nicht getrennt darstellen lassen. In ähnlichem Bereich liegen aufgrund gelelektrophoretischer Analyse auch die Molekulargewichte von gereinigten Cytochrom P-450-Präparationen PCN- bzw. PB-induzierter Rattenlebermikrosomen (Elshourbagy und Guzelian, 1980). Allerdings geben die Autoren, die für ihre Untersuchungen Gradientengele mit verbesserten Trenneigenschaften verwendeten, für die beiden Cytochromformen ein um 1 000 d differierendes Molekulargewicht an, wobei das PCN-spezifische Cytochrom P-450 mit 51 000 d die schwerere Form repräsentiert. Dies steht im Gegensatz zu der Deutung von Sharma et al. (1979), die zusätzlich zur "PB-Bande" die Induktion einer leichteren Bande durch PCN postulierten. Der Widerspruch ist aber möglicherweise auf Veränderungen der Cytochrome während des Reinigungsprozesses zurückzuführen. In einer immunologischen Untersuchung zeigten sich bei Prüfung von gereinigten PCN- und PB-Cytochrom P-450- bzw. MC-Cytochrom P-448-Präparationen keine Präzipitationsreaktionen dieser Cytochrome mit anderen als den jeweils spezifischen Antikörpern (Elshourbagy und Guzelian, 1980), ein Befund, der die Verschiedenheit der PCN- und PB-induzierten Cytochrom P-450-Formen unterstreicht.

Die Tatsache, daß in den eigenen Untersuchungen keine gelelektrophoretische Unterscheidung der präferentiell durch PCN bzw. PB induzierten Banden möglich war, ist möglicherweise entweder auf mangelnde Auftrennung der Polypeptidbanden (vergl. Sharma et al., 1979) oder auf die relative Ungenauigkeit der Molekulargewichtsbestimmungsmethode (vergl. Fußnote in 4.1.) zurückzuführen. Mit Hilfe enzymatischer und spektraler Methoden ließen sich nämlich bei den eigenen Versuchen durchaus Unterschiede zwischen PCN- und PB-induzierten Mikrosomen beobachten: Auf spektraler Ebene bleibt die leicht erhöhte Affinität des reduzierten "PCN-Cytochrom P-450" für den PB-spezifischen Liganden Metyrapon deutlich unter der von PB-Mikrosomen zurück. Auch die in der Literatur als besonders stark durch PCN induzierbar angesehene Aktivität der Äthylmorphin-N-Demethylase (Lu et al., 1972) zeigt nach PCN-Behandlung deutlich höhere Werte als nach PB-Induktion. Elshourbagy und Guzelian (1980) konnten diese Enzymaktivität mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen eine gereinigte PCN-Cytochrom P-450-Präparation in PCN-induzierten Mikrosomen - nicht aber in PB-induzierten - blockieren und interpretieren dies als Beweis für die Induktorspezifität der nach PCN-Behandlung vorliegenden Enzymaktivität.

Eine auffällige, bereits beschriebene (Pessayre und Mazel, 1976) Speziesbesonderheit bezüglich der Induktionswirkung von Rifampicin wurde in der eigenen Induktionsstudie an Ratten bestätigt: Während sowohl beim Menschen (z.B. Remmer et al., 1973; Bolt et al., 1974; 1975) als auch beim Meerschweinchen (Roots et al., 1976) und bei der Maus (Pessayre und Mazel, 1976; Heubel und Netter, 1979) erhebliche Induktionseffekte zu verzeichnen waren, konnte ein vergleichbarer induktiver Einfluß von Rifampicin auf die Rattenleber nicht festgestellt werden. In den eigenen Versuchen blieben

sowohl der Cytochrom P-450-Gehalt als auch die gemessenen Enzymaktivitäten weitgehend unbeeinflusst (Tab. 8). Nur die Epoxidhydratase-Aktivität zeigt eine deutliche Zunahme, was zu der von einigen Auto-Autoren beschriebenen antikarzinogenen Wirkung von Rifampicin (Heller et al., 1969; Toolan und Ledinko, 1972) beitragen könnte. Der Anstieg dieser Enzymaktivität korreliert mit der relativen Zunahme einer Polypeptidbande (Bande 1) im gelelektrophoretischen Trennmuster, die der Epoxidhydratase zugeordnet wird (vergl. 3.10.3.). Abgesehen von diesem Effekt traten in den Gelen keine Veränderungen auf. Es läßt sich also konstatieren, daß auch die gelelektrophoretische Analyse des Cytochrom P-450-Musters keine Hinweise für eine Induktionswirkung von Rifampicin an der Ratte erbringt.

Eine eventuelle Unterdrückung der Induzierbarkeit des Monooxygenase-Systems in Ratten aufgrund einer verstärkten irreversiblen Bindung von Rifampicin oder eines Metaboliten wie z.B. Rifampicin-Chinon (vergl. Kappus et al., 1974) an mikrosomales Protein konnten Pessayre und Mazel (1976) in einem Parallelversuch durch simultane Gabe von PB und Rifampicin ausschließen: Die erzielten Induktionseffekte waren identisch mit denen nach alleiniger PB-Vorbehandlung.

Bei der Maus versuchten Heubel und Netter (1979) in einer umfangreichen Induktionsstudie (u.a. durch Erweiterung des Spektrums der untersuchten Enzymaktivitäten) eine genauere Klassifizierung von Rifampicin im Vergleich zu den bekannten Induktor-Prototypen PB und MC vorzunehmen: Sie bezeichnen die Induktionseigenschaften von Rifampicin, die zum Teil PB-spezifisch, zum Teil aber auch MC-ähnlich sind, als atypisch und ordnen das Antibiotikum damit einer eigenen Klasse zu.

Bei Ratte und Maus hat eine akute einmalige Rifampicin-Gabe bei der unmittelbar folgenden Untersuchung von Hexobarbital-Schlafzeit und Zoxazolamin-Paralyse (gebräuchliche in vivo-Tests zum Nachweis von PB- bzw. MC-Induktion) eine Verlängerung der Wirkungsdauer der applizierten Pharmaka zur Folge (Pessayre und Mazel, 1976), die als akute Hemmung des Abbaus beider Substanzen in vivo zu deuten ist. Eine akute inhibitorische Wirkung von Rifampicin auf mikrosomale Monooxygenasen in der Leber beider Spezies konnte von den genannten Autoren in vitro am Beispiel der Äthylmorphin-N-Demethylase und auch für den oxidativen Abbau von Zoxazolamin und 17- β -Östradiol bestätigt werden. Auch Remmer et al. (1973) hatten bei ihren Untersuchungen in menschlichen Leberhomogenaten neben den induzierenden Eigenschaften des Antibiotikums einen inhibitorischen Effekt auf den mikrosomalen Metabolismus von Aminopyrin beobachtet, der aber nur dann auftrat, wenn Rifampicin zum Zeitpunkt der Entnahme der Leberproben als Medikation noch nicht abgesetzt war.

Ein derartiger Effekt - Induktion nach chronischer Behandlung und Hemmung bei akuter Gabe - ist auch bei anderen Induktoren mikrosomaler Monooxygenasen (u.a. bei den, in den eigenen Induktionsstudien verwendeten Substanzen Metyrapon und Clotrimazol einschließlich dessen Analoga) beobachtet worden.

Die bisher über die Wirkung von Rifampicin vorliegenden Literaturbefunde sind zum Teil widersprüchlich (vergl. Heubel und Netter, 1979), lassen aber deutlich erkennen, daß erhebliche Speziesunterschiede bezüglich der Suszeptibilität gegenüber einer Induktion durch Rifampicin bestehen. Worauf die fehlende Induzierbarkeit der Ratte zurückzuführen ist, ist noch unklar, zumal die Affinitäten von Rifampicin zu Lebermikrosomen der Ratte und zu denen der induzierbaren Maus keine Unterschiede auf-

weisen - wie Pessayre und Mazel (1976) aus den Ergebnissen akuter Hemmversuche mit Rifampicin in vivo und in vitro schließen.

In der vorliegenden Induktionsstudie konnte nach Gabe von Äthanol in Übereinstimmung mit der Literatur neben der Zunahme des Cytochrom P-450-Gehaltes (z.B. Kalant et al., 1976) eine Steigerung der Anilinhydroxylierung (Kalant et al., 1976; Villeneuve et al., 1976) beobachtet werden; außerdem fiel eine deutliche Zunahme der O-Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin auf (Tab. 8). Eine Induktion der letztgenannten Monooxygenase-Aktivität durch Äthanol wird auch von Ullrich et al. (1975) beschrieben. Sowohl die Steigerung der spezifischen Aktivität als auch die K_M -Werte für diese Monooxygenase-reaktion waren in den Untersuchungen dieser Autoren mit den Werten nach PB-Induktion vergleichbar. Allerdings ergab der Einsatz von Hemmstoffen in dieser Studie Hinweise für eine von der PB-induzierbaren Cytochrom-Form abtrennbare Spezies des Enzyms: Während die PB-induzierbare Form präferentiell durch Metyrapon gehemmt wurde, war für die Äthanol-induzierbare Form Tetrahydrofuran ein präferentieller Inhibitor.

Während in den eigenen Untersuchungen die als PB-typisch angesehene N-Demethylierung von Äthylmorphin nicht induzierbar war (Tab. 8), scheint die Umsatzrate einer anderen N-Demethylierungsreaktion infolge chronischer Äthanolaufnahme zuzunehmen: Luoma und Vörne (1976) konnten nach 14-tägiger Gabe von Äthanol in Rattenlebermikrosomen neben einem gegenüber Kontrollen fast verdoppelten Cytochrom P-450-Gehalt einen signifikanten Anstieg der N-Demethylierung von Methylanilin messen.

Trotz der recht deutlichen induktiven Zunahmen des Cytochrom P-450-Gehalts und verschiedener Monooxygenase-

Aktivitäten waren in den eigenen Versuchsgruppen bei quantitativer Auswertung der Gele keine Veränderungen im gelelektrophoretischen Bandenmuster nachzuweisen. Dagegen hatten Ohnishi und Lieber (1977) nach chronischer Äthanolbehandlung von Ratten die Induktion von zwei spezifischen mikrosomalen Polypeptiden in der Leber mit Molekulargewichten von 52 000 und 53 400 d beschrieben. Auch Sharma et al. (1979) konnten nach 3-wöchiger Äthanolgabe bei weiblichen Ratten Veränderungen der Polypeptidzusammensetzung der Mikrosomen feststellen: Unter Anwendung eines Gelelektrophorese-Systems, das die Differenzierung acht verschiedener, an Induktionsvorgängen beteiligter Polypeptide erlaubt, beobachten sie den Anstieg einer spezifisch nach Äthanolgabe auftretenden Bande, die als "Polypeptid VI" bezeichnet wird. Das Molekulargewicht wird nicht genau angegeben, liegt aber - wie aus den Gelen zu entnehmen ist - im Bereich von 53 000 d. Außerdem wird die schwache Zunahme einer leichteren, der Epoxidhydratase entsprechenden Bande von etwa 47 000 d erwähnt, ein Befund, der mit der leichten Erhöhung der Epoxidhydratase-Aktivität in den eigenen Versuchen (vergl. Tab. 8) in Einklang steht.

Obwohl einige Untersuchungsergebnisse verschiedener Autoren PB-ähnliche Induktionseffekte nach Äthanolbehandlung von Ratten ausweisen (z.B. Kalant et al., 1976; Luoma und Vorne, 1976), muß aufgrund der Befunde anderer Autoren zur differentiellen Hemmung (Ullrich et al., 1975) und der eigenen Ergebnisse (fehlender Anstieg PB-typischer Enzymaktivitäten wie z.B. Äthylmorphin-N-Demethylierung; Fehlen der Affinitätszunahme für Metyrapon und Ausbleiben einer relativen Zunahme der 51 000 d-Bande in den Gelen) angenommen werden, daß Äthanol als Induktor für Cytochrom P-450 und mikrosomale Monooxygenasen eine eigene Klasse bildet.

5. Zusammenfassung

1. Werden Ratten mit dem polycyclischen Kohlenwasserstoff 3-Methylcholanthren behandelt, dann kommt es in den Lebermikrosomen zu einer Verstärkung zweier gelelektrophoretisch darstellbarer Proteinuntereinheiten mit Molekulargewichten von ca. 55 000 Dalton und 57 000 Dalton. Diese Banden, die möglicherweise zwei verschiedene Cytochrom P-450-Formen repräsentieren, steigen um den Faktor 3 bzw. 2 an, während die bei unbehandelten Tieren dominierende Bande mit einem Molekulargewicht von 51 000 Dalton deutlich abnimmt. Die für eine Induktion mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen charakteristischen enzymatischen und spektralen Veränderungen in den Lebermikrosomen (20fache Steigerung der Biphenyl-2-Hydroxylase-Aktivität, zunehmende Blauverschiebung des CO-Spektrums und ein sukzessiver Affinitätsverlust der reduzierten Mikrosomen für den Liganden Metyrapon) verlaufen zeitlich parallel mit den Veränderungen im gelelektrophoretischen Trennmuster, wobei eine besonders klare Korrelation der enzymatischen und spektralen Parameter mit der 55 000 Dalton-Bande auffällt. Die Ergebnisse zeigen, daß die 55 000 Dalton-Bande in engem Zusammenhang mit den durch polycyclische Kohlenwasserstoffe induzierbaren Veränderungen steht, lassen jedoch vermuten, daß auch die 57 000 Dalton-Bande induktorspezifisches Hämoprotein repräsentiert. Eine Zuordnung der einzelnen Induktionsparameter zu beiden induzierbaren Polypeptidbanden war allerdings nicht möglich.

2. Einmalige Phenobarbital-Behandlung erhöht - parallelverlaufend mit dem Anstieg des Cytochrom P-450-Gehalts, einer Affinitätszunahme der Mikrosomen für Metyrapon und einer Steigerung der Äthylmorphin-N-Demethylase-Aktivität - den relativen Anteil der 51 000 Dalton-Bande am Gesamtprotein um 80 %. Es zeigt sich eine enge Korrelation dieser Bande mit der Steigerung der Äthylmorphin-N-Demethylase-Aktivität.

3. Mischinduktion mit simultan verabreichten Einzeldosen der entgegengesetzt wirkenden Induktoren 3-Methylcholanthren und Phenobarbital resultiert in wenig auffälligen Veränderungen des gelelektrophoretischen Trennmusters. Hier zeigt sich nur ein Anstieg der 55 000 Dalton-Bande, deren prozentualer Anteil sich im Verlauf der Beobachtungsperiode verdoppelt.

Die enzymatischen und spektralen Parameter entwickeln sich unter der Mischinduktion nicht einheitlich: Im Anstieg der Biphenyl-2-Hydroxylierung und in der Blauverschiebung des CO-Spektrums kommt der Induktionseffekt des polycyclischen Kohlenwasserstoffs voll zur Ausprägung; sein Zusammenhang mit der 55 000 Dalton-Bande wird dadurch unterstrichen. Die starke Affinitätszunahme für Metyrapon beweist die Induktion hochaffiner Bindungsstellen für den Liganden, ohne daß gelelektrophoretisch phenobarbitaltypische Veränderungen in Form einer Zunahme der 51 000 Dalton-Bande erkennbar sind.

4. Die Induktion mehr als einer Cytochrom P-450-Form durch polycyclische Kohlenwasserstoffe, die sich in der Zunahme zweier Polypeptidbanden bei der erwachsenen 3-methylcholanthrenbehandelten Ratte andeutet, kann bei mehreren Nagerspezies im Verlauf der perinatalen Entwicklung zeitlich dissoziiert werden. Drei induktionstypische Veränderungen, die Induzierbarkeiten der Arylhydrocarbon- und der Acetanilid-4-Hydroxylase und die Blauverschiebung des CO-Spektrums weisen bei Ratte, Maus, Kaninchen und Sigmodon hispidus nichtsynchrone Entwicklungsverläufe auf. Es muß angenommen werden, daß die drei genannten Induktionsparameter mit verschiedenen Cytochrom P-450-Formen assoziiert sind. Das Auftreten zweier induktorspezifischer Polypeptidbanden steht zeitlich im Zusammenhang mit der Induzierbarkeit jeweils einer bestimmten Monooxygenase-Aktivität: Dies ist besonders auffällig beim Kaninchen, aber auch bei Ratte und Maus kann eine

schon zu sehr frühen Entwicklungszeitpunkten induzierbare Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 56000 und 57000 d der Induzierbarkeit der Arylhydrocarbonhydroxylase-Aktivität und eine leichtere, später induzierbare gelelektrophoretische Bande der Induzierbarkeit der Acetanilid-4-Hydroxylase-Aktivität zugeordnet werden.

5. Bereits während der späten Fetalperiode kann durch spezifische Bindung des hochpotenten Induktors TCDD in den Lebern der meisten untersuchten Spezies ein cytosolischer Rezeptor für polycyclische Kohlenwasserstoffe nachgewiesen werden, dessen Aufgabe in der Bindung des Induktors und seinem Transport in den Kern gesehen wird. Die Konzentration dieses Rezeptors steigt in der Zeitspanne zwischen Geburt und Alter von 3 bis 4 Wochen auf ein Maximum und fällt danach wieder ab. Grob gesehen spiegelt dieser Verlauf die Induzierbarkeit der Monooxygenaseaktivitäten durch polycyclische Kohlenwasserstoffe wider; im Detail läßt sich eine exakte zeitliche Parallelität zwischen Rezeptorkonzentration und Induzierbarkeit der Monooxygenasen besonders im perinatalen Zeitraum jedoch nicht nachweisen. Das bedeutet, daß die Anwesenheit des cytosolischen Rezeptors allein noch nicht die Induzierbarkeit der Monooxygenasen garantiert.

6. Vorbehandlung von Ratten mit dem Antimykotikum Clotrimazol bewirkt eine starke, mit dem Effekt von Phenobarbital vergleichbare Zunahme des Cytochrom P-450-Gehalts und beeinflußt die untersuchten Enzymaktivitäten phenobarbitalähnlich. Gelelektrophoretisch läßt sich eine Verdoppelung des prozentualen Anteils der 51 000 Dalton-Bande am mikrosomalen Gesamtprotein bei gleichzeitiger Abnahme der methylcholanthrenspezifischen Banden (55 000 bzw. 57 000 Dalton) nachweisen. Die drei untersuchten Clotrimazol-Analoga erweisen

sich als weniger effektive Induktoren; das Induktionsmuster ähnelt aber qualitativ dem von Clotrimazol bzw. Phenobarbital.

7. Metyrapon, präferentieller Ligand für Phenobarbital-Cytochrom P-450 und präferentieller Hemmstoff für phenobarbitalinduzierbare Monooxygenasen, erweist sich als ein schwacher Induktor vom Phenobarbital-Typ: Die Induktionswirkungen kommen neben einem Anstieg des Cytochrom P-450-Gehalts in einer schwachen phenobarbitalartigen Steigerung der Monooxygenase-Aktivitäten, der Epoxidhydratase-Aktivität und der Affinität der reduzierten Mikrosomen für den Liganden Metyrapon zum Ausdruck. Gelelektrophoretisch zeigt sich wie nach Phenobarbital ein Anstieg der 51 000 Dalton-Bande.

8. Obwohl das durch gelelektrophoretische Auftrennung der mikrosomalen Proteine nach Behandlung mit dem synthetischen Steroid Pregnenolon-16 α -carbonitril erhaltene Bandenmuster dem nach Phenobarbitalinduktion stark ähnelt, sprechen sowohl spektrale Befunde (a) als auch Beobachtungen auf enzymatischer Ebene (b) eher für eine Zuordnung zu einer eigenen Induktorklasse:
(a) Die Affinitätszunahme der Mikrosomen für den Liganden Metyrapon ist deutlich schwächer ausgeprägt als nach Phenobarbital-Induktion, und (b) ein erheblich stärkerer Anstieg der Äthylmorphin-N-Demethylase-Aktivität, als ihn eine Phenobarbital-Behandlung bewirkt, wird beobachtet.

9. Durch Rifampicin-Behandlung ist bei der Ratte - im Gegensatz zu verschiedenen anderen Säugerspezies, - keine Induktion von Cytochrom P-450 und assoziierten Monooxygenasen zu erreichen. Im gelelektrophoretischen Trennmuster der Mikrosomen zeigt sich als einzige Veränderung eine leichte relative Zunahme der Polypeptidbande von ca. 49 000 Dalton, die der Epoxidhydratase

zugeordnet wird, und deren Anstieg mit dem der gefundenen Steigerung dieser Enzymaktivität korreliert.

10. Trotz deutlicher Zunahme des Cytochrom P-450-Gehalts und Steigerung verschiedener auch durch polycyclische Kohlenwasserstoffe induzierbarer Monooxygenaseaktivitäten nach chronischer Behandlung mit Äthanol waren gelelektrophoretisch und spektral keine Veränderungen nachweisbar. Fehlender Anstieg phenobarbitaltypischer Enzymaktivitäten wie Äthylmorphin-N-Demethylase und Epoxidhydratase sowie Fehlen der Affinitätszunahme der reduzierten Mikrosomen für Metyrapon und Ausbleiben einer Zunahme der phenobarbitalinduzierbaren 51 000 Dalton-Bande in den Gelen charakterisieren Äthanol als einen von Phenobarbital verschiedenen Induktor, der vermutlich einer eigenen Klasse zugeordnet werden muß.

6. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- ALVARES, A.P., SCHILLING, G., LEVIN, W., and KUNTZMAN, R.: Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 29, 521-526 (1967)
- ALVARES, A.P., SCHILLING, G., and KUNTZMAN, R.: Differences in the kinetics of benzpyrene hydroxylation by hepatic drug-metabolizing enzymes from phenobarbital and 3-methylcholanthrene-treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 30, 588-594 (1968)
- ALVARES, A.P., SCHILLING, G., LEVIN, W., and KUNTZMAN, R.: Inability of substrates to alter the carbon monoxide and the ethyl isocyanide difference spectra of microsomal hemoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176, 1-10 (1971)
- ALVARES, A.P. and SIEKEWITZ, P.: Gelelectrophoresis of partially purified cytochromes P-450 from liver microsomes of variously treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 54, 923-929 (1973)
- ANDERS, M.W. and MANNERING, G.J.: Inhibition of drug metabolism. I. Kinetics of the inhibition of the N-demethylation of ethylmorphine by 2-diethylaminoethyl 2,2-diphenylvalerate (SKF 525-A) and related compounds. *Mol. Pharmacol.* 2, 319-327 (1966)
- ARGUS, M.F. HOCH-LIGETI, C., ARCOS, J.C., and Conney, A.H.: Differential effects of β -naphthoflavone and pregnenolone-16 α -carbonitrile on dimethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *J. Natl. Canc. Inst.* 61, 441-449 (1978)
- ATLAS, S.A., THORGEIRSSON, S.S., BOOBIS, A.R., KUMAKI, K., and NEBERT, D.W.: Differential induction of murine Ah-locus-associated monooxygenase activities in rabbit liver and kidney. *Biochem. Pharmacol.* 24, 2111-2116 (1975)

- ATLAS, S.A., BOOBIS, A.R., FELTON, J.S., THORGEIRSSON, S.S., and NEBERT, D.W.: Ontogenetic expression of polycyclic aromatic compound-inducible monooxygenase activities and forms of cytochrom P-450 in the rabbit. Evidence for temporal control and organ specificity of two genetic regulatory systems. *J. Biol. Chem.* 252, 4712-4721 (1977)
- BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag 1964, S. 45
- BEATO, M., and FEGELSON, P.: Glucocorticoid-binding proteins of rat liver cytosol. I. Separation and identification of the binding proteins. *J. Biol. Chem.* 247, 7890-7896 (1972)
- BELL, D.Y. and HODGSON, E.: Methods for polyacrylamide gel electrophoresis of mammalian liver cytochrome P-450 in the presence of sodium dodecyl sulfate: A critique. *Gen. Pharmac.* 8, 113-119 (1977)
- BELL, D.Y. and HODGSON, E.: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of hepatic cytochrome P-450 from normal, 3-methylcholanthrene and phenobarbital treated mice. *Gen. Pharmac.* 8, 121-127 (1977a)
- BERGMANN, R., BARTH, A., ZAUMSEIL, J., und KLINGER, W.: Einfluß von Metyrapon auf Gallenfluß und Gallensäureausscheidung bei Wistar-Ratten. *Acta biol. med. germ.* 38, 1193-1200 (1979)
- BERLIN, C.M. and SCHIMKE, R.T.: Influence of turnover rates on the responses of enzymes to cortisone. *Molec. Pharmacol.* 1, 149-156 (1965)
- BILLINGS, R.E. and McMAHON, R.E.: Microsomal biphenyl hydroxylation on the formation of 3-hydroxy-biphenyl and biphenyl catechol. *Mol. Pharmacol.* 14, 145-154 (1978)

- BISSEL, G.W., SCOTT, A.L., FARNSWORTH, W.E., and WINKLER, J.: A preliminary study of the use of 2-methyl-1,2-bis (3-pyridyl)-1-propanone (SU 4885) as a test of pituitary function in man. New York State J. Med. 59, 3596-3608 (1959)
- BLUNCK, W. und BIERICH, J.R.: Differenzierte Auswertung des Metopirontests durch Dünnschichtchromatographie. Klin. Wschr. 46, 202-207 (1968)
- BOLT, H.M.: Nebenwirkungen von Rifampicin und ihre biochemischen Grundlagen (Übersicht). Dtsch. med. Wschr. 100, 63-65 (1975)
- BOLT, H.M., KAPPUS, H. und BOLT, M.: Rifampicin and oral contraception. Lancet 1974 I, 1280-1281
- BOLT, H.M., KAPPUS, H. und BOLT, M.: Effect of rifampicin treatment on the metabolism of oestradiol and 17 α -ethinyloestradiol by human liver microsomes. Europ. J. clin. Pharmacol. 8, 301-307 (1975)
- BOOBIS, A.R., NEBERT, D.W., and FELTON, J.S.: Comparison of β -naphthoflavone and 3-methylcholanthrene of hepatic cytochrome(s) P-448 and aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase activity. Mol. Pharmacol. 13, 259-268 (1977)
- BOUBELIK, M., LENGEROVA, A., BAILEY, D.W., and MATOUSSEK, V.: A model for genetic analysis of programmed gene expression as reflected in the development of membrane antigens. Dev. Biol. 47, 206-214 (1975)
- BOYLAND, E.: Biological significance of metabolism of polycyclic compounds. Symp. Biochem. Soc. 5, 40-54 (1950)
- BRODIE, B.B. and AXELROD, J.: The fate of acetophenetidin (phenacetin) in man and methods for the estimation of acetophenetidin and its metabolites in biological material. J. Pharmacol. Exp. Ther. 97, 58-67 (1949)

- BRODIE, B.B., AXELROD, J., COOPER, J.R., GAUDETTE, L.,
LaDU, B.N., MITOMA, C., and UDENFRIEND, S.:
Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* 121, 603-604 (1955)
- BRODIE, B.B., GILLETTE, J.R., and LaDU, B.N.: Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 27, 427-454 (1958)
- BROOKES, P. and LAWLEY, P.D.: Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature (Lond.)* 202, 781-784 (1964)
- BUCHEL, K.H., DRABER, W., REGEL, W. und PLEMPPEL, M.:
Synthesen und Eigenschaften von Clotrimazol und weiteren antimykotischen 1-Triphenylmethylimidazolen. *Arzneimittel-Forsch.* 22, 1260-1272 (1972)
- BUSH, M.T. and WELLER, W.L.: Metabolic fate of hexobarbital (HB). *Drug Metab. Rev.* 1, 249-290 (1972)
- CAPDEVILLA, J., JERNSTROM, B., VADI, H., and ORRENIUS, S.: Cytochrome P-450-like activation of 3-hydroxybenzo(a)pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 894-900 (1975)
- CHAPMAN, V., FELTON, J., MEISLER, M., and PAIGEN, K.: A locus determining the developmental pattern of mouse β -galactosidase. *Genetics* 74, suppl. 2, part 2, s 44 (1973)
- CHART, J.J., SHEPPARD, H., ALLEN, M.J., BENCZE, W.L. and GAUNT, R.: New amphenone analogs as adrenocortical inhibitors. *Experientia* 14, 151-155 (1958)

- CLARK, J.H., HARDIN, J.W., UPCHURCH, S., and ERIKSSON, H.: Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 253, 7630-7634 (1978)
- CONNEY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19, 317-366 (1967)
- CONNEY, A.H.: Environmental factors influencing drug metabolism. Chap. 13, pp. 253-278. In: *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*. B.N. La Du, H.G. Mandel and E.L. Way (eds.), Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1971
- CONNEY, A.H. and GILMAN, A.G.: Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. *J. Biol. Chem.* 238, 3682-3693 (1963)
- CONNEY, A.H., MILLER, E.C., and MILLER, J.A.: The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 16, 450-456 (1956)
- CONNEY, A.H., DAVISON, C., GASTEL, R., and BURNS, J.J.: Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes by phenobarbital and other drugs. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 130, 1-8 (1960)
- COOPER, D.Y., LEVIN, S., NARASIMHULU, S., ROSENTHAL, O., and ESTABROOK, R.W.: Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147, 400-402 (1965)
- CREAVEN, P.J., and PARKE, D.V.: The stimulation of hydroxylation by carcinogenic and non-carcinogenic compounds. *Biochem. Pharmacol.* 15, 7-16 (1966)

- CREAVEN, P.J., PARKE, D.V., and WILLIAMS, R.T.: A fluorimetric study of the hydroxylation of bi-phenyl in vitro by liver preparations of various species. *Biochem. J.* 96, 879-885 (1965)
- CULLEN, S.J. and CATALANO, P.M.: Griseofulvin-warfarin antagonism. *J. Amer. Med. Ass.* 199, 582-583 (1967)
- DEPIERRE, J.W. and ERNSTER, L.: The metabolism of polycyclic hydrocarbons and its relationship to cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 473, 149-186 (1978)
- DICKINSON, W.J.: A genetic locus affecting the developmental expression of an enzyme in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 42, 131-140 (1975)
- DIPPEL, C. und FERGUSON, J.H.: Effect of chronic ethanol administration on liver alcohol dehydrogenase activity in mice. *Biochem. Pharmacol.* 26, 441-442 (1977)
- EDWARDS, O.M., COURTENAY-EVANS, R.J., GALLEY, J.M., HUNTER, J, and TAIT, A.D.: Changes in cortisol metabolism following rifampicin therapy. *Lancet* 1974 II, 549-551
- ELSHOURBAGY, NA. and GUZELIAN, P.S.: Separation, purification and characterisation of a novel form of hepatic cytochrome P-450 from rats treated with pregnonolone-16 α -carbonitrile. *J. Biol. Chem.* 255, 1279-1285 (1980)
- ERNSTER, L. and ORRENIUS, S.: Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system of liver microsomes. *Fed. Proc.* 24, 1190-1199 (1965)
- ESTABROOK, R.W.: Cytochrome P-450 - Its function in the oxidative metabolism of drugs. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Brodie, B.B., Gillette, J.R. (eds.) Vol. 28, Part 2, pp. 264-284, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1971

- FAIRBANKS, G., STECK, T.L., and WALLACH, D.F.H.:
Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.
Biochemistry 10, 2606-2617 (1971)
- FEUER, G., SOSO-LUCERO, J.C., LUMB, G., and MODEL, G.:
Failure of various drugs to induce drug-metabolizing enzymes in extrahepatic tissues of the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19, 579-589 (1971)
- FOUTS, J.R. and ROGERS, A.: Morphological changes in the liver accompanying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activity by phenobarbital, chlordane, benzpyrene or methylcholanthrene in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 147, 112-119 (1965)
- FÜRESZ, S., SCOTTI, R., PALLANZA, R., and MAPELLI, E.:
Rifampicin: a new rifamycin. III. *Arzneimittel-Forsch.* 17, 534-537 (1967)
- FUJITA, T. and MANNERING, G.J.: Differences in soluble P-450 hemoproteins from livers of rats treated with phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Chem. Biol. Interactions* 3, 264-265 (1971)
- GARFINKEL, D.: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archs. Biochem. Biophys.* 77, 493-509 (1958)
- GEHLY, E.B., FAHL, W.E., JEFCOATE, C.R., and HEIDELBERGER, C.: The metabolism of benzo(a)pyrene by cytochrome P-450 in transformable and nontransformable C3H mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 254, 5041-5048 (1979)
- GELBOIN, H.V. and BLACKBURN, N.R.: The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on benzpyrene hydroxylase activity in several rat tissues. Inhibition by actinomycin D and puromycin. *Cancer Res.* 24, 356-360 (1964)

- GELBOIN, H.V., HUBERMAN, E., and SACHS, L.: Enzymatic hydroxylation of benzopyrene and its relations to cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64, 1188-1194 (1969)
- GERLACH, R.: Zeitverlauf der inhibitorischen Aktivität von Cycloheximid auf die Synthese von Cytochrom P-448 in Ratten nach Gabe von 3-Methylcholanthren. Medizinische Inaugural-Dissertation, Mainz 1977
- GIANOPOULOS, G.: Ontogeny of glucocorticoid receptors in rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5847-5851 (1975)
- GIELEN, J.E., GOUJON, F.M. and NEBERT, D.W.: Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. II. Simple mendelian expression in mouse tissues in vivo. *J. Biol. Chem.* 247, 1125-1137 (1972)
- GIGON, P.L. and BICKEL, M.: Drug metabolism by hepatic microsomes from phenobarbital-treated or starved male and female rats in the presence of inhibitors. *Life Sci.* 10, 163-171 (1971)
- GILLETTE, J.R.: Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms. *Progr. Drug Res.* 6, 13-73 (1963)
- GILLETTE, J.R.: Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum. *Advanc. Pharmacol.* 4, 219-261 (1966)
- GILLETTE, J.R., BRODIE, B.B., and LaDU, B.N.: The oxidation of drugs by liver microsomes: On the role of TPNH and oxygen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 119, 532-540 (1957)
- GILLETTE, J.R., MITCHELL, J.R., and BRODIE, B.B.: Biochemical mechanisms of drug toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol.* 14, 271-288 (1974)

- GOUJON, F.M., NEBERT, D.W., and GIELEN, J.E.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. IV. Interaction of various compounds with different forms of cytochrome P-450 and the effect on benzo(a)pyrene metabolism in vitro. *Mol. Pharmacol.* 8, 667-680 (1972)
- GRANDJEAN, C.J. and SOMOGYI, A.: Effect of pregnenolone-16 α -carbonitrile on the metabolism of dimethyl nitrosamine and binding to rat liver macromolecules. *Biochem. Pharmacol.* 25, 2097-2098 (1976)
- GREENLEE, W.F. and POLAND, A.: Nuclear uptake of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. Role of the hepatic cytosol receptor protein. *J. Biol. Chem.* 254, 9814-9821 (1979)
- GREIG, J.B. and DeMATTEIS, F.: Effects of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on drug metabolism and hepatic microsomes of rats and mice. *Environ. Health Perspec., Exp. Issue* 5, 211-214 (1973)
- GROVER, P.L. and SIMS, P.: Enzyme catalysed reactions of polycyclic hydrocarbons with DNA and protein in vitro. *Biochem. J.* 100, 159-160 (1968)
- GUENGERICH, F.P.: Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450: activities of different forms of cytochrome P-450 towards several compounds of environmental interest. *J. Biol. Chem.* 252, 3970-3979 (1977)
- GUENGERICH, F.P.: Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochromes P-450 partial characterization of three apparently homogeneous cytochromes P-450 isolated from liver microsomes of phenobarbital- and 3-methylcholanthrene-treated rats. *J. Biol. Chem.* 253, 7931-7939 (1978)

- GUENGERICH, F.P.: Isolation and purification of cytochrome P-450, and the existence of multiple forms. *Pharmac. Ther.* 6, 99- 121 (1979)
- GUENTHNER, T.M. and MANNERING, G.J.: Induction of hepatic mono-oxygenase systems in fetal and neonatal rats with phenobarbital, polycyclic hydrocarbons and other xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* 26, 567-575 (1977)
- GUENTHNER, T.M. and NEBERT, D.W.: Evidence in rat and mouse liver for temporal control of two polycyclic aromatic-inducible forms of cytochrome P-450. *Eur. J. Biochem.* 91, 449-456 (1978)
- GUENTHNER, T.M., NEGISHI, M., and NEBERT, D.W.: Separation of acetanilide and its hydroxylated metabolites and quantitative determination of "acetanilide 4-hydroxylase activity" by high-pressure liquid chromatography. *Analyt. Biochem.* 96, 201-207 (1979)
- HASHIMOTO, C. and IMAI, Y.: Purification of a substrate complex of cytochrome P-450 from liver microsomes of 3-methylcholanthrene-treated rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 821-827 (1976)
- HAUGEN, D.A. and COON, M.J.: Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and β -naphthoflavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 251, 7929-7939 (1976)
- HAUGEN, D.A., van der HOEVEN, T.A. and COON, M.J.: Purified liver microsomal cytochrome P-450: Separation and characterization of multiple forms. *J. Biol. Chem.* 250, 3567-3570 (1975)
- HAUGEN, D.A., COON, M.J. and NEBERT, D.W.: Induction of multiple forms of mouse liver cytochrome P-450. Evidence for genetically controlled *de novo*-protein synthesis in response to treatment with β -naphthoflavone or phenobarbital. *J. Biol. Chem.* 251, 1817-1827 (1976)

- HAWKINS, R.D., KALANT, H., and KHANNA, M.: Effects of chronic intake of ethanol on rate of ethanol metabolism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 44, 241-257 (1966)
- HAYAISHI, O.: Oxygenases. In: International Congress of Biochemistry, 6th, New York, Proceedings of the Plenary Sessions and the Program, Vol. 33, pp. 31-43, Washington, D.C., 1964
- HELLER, E., ARGAMAN, M., LEVY, H., and GOLDBLUM, N.: Selective inhibition of vaccinia virus by the antibiotic Rifampicin. *Nature (Lond.)* 222, 273-274 (1969)
- HENNING, S.J., BALLARD, P.L., and KRETCHMER, N.: A study of the cytoplasmic receptors for glucocorticoids in intestine of pre- and postweanling rats. *J. Biol. Chem.* 250, 2073-2079 (1975)
- HEUBEL, F. and NETTER, K.J.: Atypical inductive properties of rifampicin. *Biochem. Pharmacol.* 28, 3373-3378 (1979)
- HILDEBRANDT, A. and ESTABROOK, R.W.: Evidence for the participation of cytochrome b₅ in hepatic mixed function oxidation reactions. *Archs. Biochem. Biophys.* 143, 66-75 (1971)
- HILDEBRANDT, A., REMMER, H., and ESTABROOK, R.W.: Cytochrome P-450 of liver microsomes - one Pigment or many? *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 30, 607-612 (1968)
- HILDEBRANDT, A.G., LEIBMAN, K.C., and ESTABROOK, R.W.: Metyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37, 477-485 (1969)

- JEFCOATE, C.R.E. and GAYLOR, J.L.: Ligand interactions with cytochrome P-450. II. Influence of phenobarbital and methylcholanthrene induction processes on P-450 spectra. *Biochemistry* 8, 3464-3472 (1969)
- JENKINS, J.S., MEAKIN, J.W., and NELSON, D.H.: A comparison of the inhibitory effects of 2-methyl-1,2-bis(3-pyridyl)-1-propanone and amphenone B on adrenal cortical secretion in the dog. *Endocrinology* 64, 572-578 (1959)
- JOHNSON, E.F. and MULLER-EBERHARD, U.: Resolution of two forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of rabbits treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Biol. Chem.* 252, 2839-2845 (1979)
- JONEN, H.G., HÜTHWOHL, B., KAHL, R., and KAHL, G.F.: Influence of pyridine and some pyridine derivatives on spectral properties of reduced microsomes and on microsomal drug metabolizing activity. *Biochem. Pharmacol.* 23, 1319-1329 (1974)
- KAHL, G.F. and NETTER, K.J.: The effect of metyrapone on cellular respiration and microsomal drug oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 19, 27-34 (1970)
- KAHL, G.F. and SIMON, S.: Action of metyrapone on the redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide and on oxygen consumption of perfused rat livers and isolated mitochondria. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.* 268, 1-16 (1971)
- KAHL, G.F., ZIMMER, B., GALINSKY, T., JONEN, H.G., and KAHL, R.: Induction of cytochrome P-448 by 3-methylcholanthrene in the rat during inhibition of protein synthesis in vivo. pp. 551-558. In: *Microsomes and Drug Oxidations*, V. Ullrich et al.(eds.), Pergamon Press, Oxford and New York, 1977
- KAHL, G.F., KLAUS, E., JONEN, H.G., and KAHL, R.: Enzymic control of irreversible binding of metabolically activated benzo(a)pyrene in perfused rat liver by monooxygenase activity. *Arch. Toxicol.* 39, 149-158 (1977a)

- v.d. HOEVEN, T.A. and COON, M.J.: Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 249, 6302-6310 (1974)
- HOLT, R.J.: Laboratory and clinical studies with clotrimazole. *Postgraduate Medical Journal*, July Suppl , 24-26 (1974)
- HUANG, M.-T., WEST, S.B., and LU, A.Y.H.: Separation, purification and properties of multiple forms of cytochrome P-450 from the liver microsomes of phenobarbital-treated mice. *J. Biol. Chem.* 251, 4659-4665 (1976)
- HUBERMAN, E., SACHS, L., YANG, S.K., and GELBOIN, H.V.: Identification of mutagenic metabolites of benzo-(a)pyrene in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 73, 607-611 (1976)
- IMAI, Y. and SATO, R.: Evidence for two forms of P-450 hemoprotein in microsomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 5-11 (1966)
- IMAI, Y. and SATO, R.: A gel-electrophoretically homogeneous preparation of cytochrome P-450 from liver microsomes of phenobarbital-pretreated rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 8-14 (1974)
- ISERI, S.A., LIEBER, C.S., and GOTTLIEB, L.S.: Ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Amer. J. Pathol.* 48, 535-555 (1966)
- JACOB, S.T., SCHARF, M.B., and VESSEL, E.S.: Role of RNA in induction of hepatic microsomal mixed function oxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)* 71, 704-707 (1974)

- KAHL, R., FRIEDERICI, D.E., KAHL, G.F., RITTER, W., and KREBS, R.: Clotrimazole as an inhibitor of benzo(a)pyrene metabolite-DNA adduct formation in vitro and of microsomal monooxygenase activity. Drug Metab. Disposition, in press (1980)
- KALANT, H., KHANNA, J.M., LIN, G.Y., and CHUNG, S.: Ethanol - a direct inducer of drug metabolism. Biochem. Pharmacol. 25, 337-342 (1976)
- KAPITULNIK, J., WISLOCKI, P.G., Levin, W., YAGI, H., JERINA, D.M., and CONNEY, A.H.: Tumorigenicity studies with diol-epoxides of benzo(a)pyrene which indicate that (+)-*trans*-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice. Cancer Res. 38, 354-358 (1978)
- KAPPUS, H., BOLT, H.M., and REMMER, H.: Covalent protein binding of different drugs in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 285, R 38 (1974)
- KAROBATH, M., PLACHETA, P., LIPPITSCH, M., and LARSEN, P.K.: Is stimulation of benzodiazepine receptor binding mediated by a novel GABA receptor. Nature 278, 748-849 (1979)
- KATER, R.M.H., ROGGIN, G., TOBON, F., ZIEVE, P., and IBER, F.L.: Increased rate of clearance of drugs from the circulation of alcoholics. Amer. J. med. Sci. 258, 35-39 (1969)
- KATO, R.: Characteristics and differences in the hepatic mixed function oxidases of different species. Pharmac. Ther. 6, 41-98 (1979)
- KATO, R. and GILLETTE, J.R.: Effect of starvation on NADPH-dependent enzymes in liver microsomes of male and female rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 150, 279-284 (1965)

- KATO, R., LOEB, L., and GELBOIN, H.V.: Microsome-specific stimulation by phenobarbital of amino acid incorporation in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 14, 1164-1166 (1965)
- KATO, R., JONDORF, W.R., LOEB, L.A., BEN, T., and GELBOIN, H.V.: Studies on the mechanism of drug induced microsomal enzyme activities. V. Phenobarbital stimulation of endogenous messenger RNA and polyuridylic acid-directed L-[¹⁴C]-phenylalanine incorporation. *Mol. Pharmacol.* 2, 171-186 (1966)
- KLINGENBERG, M.: Pigments of rat liver microsomes. *Archs. Biochem. Biophys.* 75, 376-386 (1958)
- KOBLINSKY, M., BEATO, M., KALIMI, M., and FEIGELSON, P.: Glucocorticoid-binding proteins of rat liver cytosol. II. Physical characterization and properties of the binding proteins. *J. Biol. Chem.* 247, 7897-7904 (1972)
- KOUROUNAKIS, P., SZABO, S., and SELYE, H.: Effect of fluorosteroids on drug response and metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 25, 477-481 (1976)
- KRAULIS, J., TRAIKOV, H., LI, M.P., LANTOS, C.P., and BIRMINGHAM, M.K.: The reduction of Su-4885 by adrenal glands and other tissues and its inhibition by ACTH. *Can. J. Biochem.* 46, 463-468 (1968)
- KUNTZMAN, R., JACOBSON, M., SCHNEIDMAN, K., and CONNEY, A.H.: Similarities between oxidative drug-metabolizing enzymes and steroid hydroxylases in liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 146, 280-285 (1964)
- LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227, 680-685 (1970)

- LEIBMAN, K.C.: Effects of metyrapone on liver microsomal drug oxidations. *Mol. Pharmacol.* 5, 1-9 (1969)
- LEVIN, W. und KUNTZMAN, R.: Studies on the incorporation of δ -aminolevulinic acid into microsomal hemoprotein: effect of 3-methylcholanthrene and phenobarbital. *Life Sci.* 8, 305-311 (1969)
- LEVIN, W., LU, A.Y.H., RYAN, D., WEST, S., KUNTZMAN, R., and CONNEY, A.H.: Partial purification and properties of cytochromes P-450 and P-448 from rat liver microsomes. *Archs. Biochem. Biophys.* 153, 543-553 (1972)
- LEVIN, W., RYAN, D., WEST, S., and LU, A.Y.H.: Preparation of partially purified, lipid-depleted cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 249, 1747-1754 (1974)
- LEVIN, W., LU, A.Y.H., THOMAS, P.E., RYAN, D., KIZER, D.E., and GRIFFIN, M.J.: Identification of epoxide hydase as the preneoplastic antigen in rat liver hyperplastic nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3240-3243 (1978)
- LEYBOLD, K. und STAUDINGER, H.: Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel von Rattenlebermikrosomen. *Biochem. Zschr.* 331, 389-398 (1959)
- LIDDLE, G.W., ISLAND, D., LANCE, E.M. and HARRIS, A.P.: Alterations of adrenal steroid patterns in man resulting from treatment with a chemical inhibitor of 11- β -hydroxylation. *J. clin. Endocr.* 18, 906-912 (1958)
- LIEBER, C.S. and DeCARLI, L.M.: Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem.* 245, 2505-2512 (1970)

- LIEBER, C.S. and DeCARLI, L.M.: The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 181, 279-287 (1972)
- LIEBER, C.S., TESCHKE, R., HASUMURA, Y., and DeCARLI, L.M.: Differences in hepatic and metabolic changes after acute and chronic alcohol consumption. *Fed. Proc.* 34, 2060-2074 (1975)
- LIPPMAN, M.E. and THOMPSON, E.B.: Differences between cytoplasmic glucocorticoid-binding proteins shown by heterogeneity of nuclear acceptor sites. *Nature* 246, 352-355 (1973)
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- LU, A.Y.H., and WEST, S.B.: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. III. Properties of the reconstituted 3,4-benzpyrene hydroxylase system. *Mol. Pharmacol.* 8, 490-500 (1972)
- LU, A.Y.H., SOMOGYI, A., WEST, S., KUNTZMAN, R., and CONNEY, A.H.: Pregnenolone-16 α -carbonitrile: A new type of inducer of drug-metabolizing enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 457-462 (1972)
- LU, A.Y.H., LEVIN, W., WEST, S.B., JACOBSON, M., RYAN, D., KUNTZMAN, R., CONNEY, A.H.: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. Different substrate specificities of the cytochrome P-450 fractions from control and phenobarbital-treated rats. *J. Biol. Chem.* 248, 456-460 (1973)

- LUOMA, P. and VORNE, M.: Changes in the hepatic microsomal enzyme activity during long-term ethanol feeding in rat. *Acta pharmacol. toxicol.* 38, 260-266 (1976)
- LUSIS, A.J. and PAIGEN, K.: Genetic determination of the α -galactosidase developmental program in mice. *Cell* 6, 371-378 (1975)
- MAGGI, N., PASQUALUCCI, C.R., BALLOTTA, R. und SENSI, P.: Rifampicin: A new orally active rifamycin. *Chemotherapia (Basel)* 11, 285-292 (1966)
- MASON, H.S.: Mechanism of oxygen metabolism. *Advanc. Enzymol.* 19, 79-233 (1957)
- MCCLEARN, G.E., BENNET, E.L., HERBERT, M.J., KAKIHANA, R., and SCHLESINGER, K.: Alcohol dehydrogenase activity and previous ethanol consumption in mice. *Nature (Lond.)* 203, 793-794 (1964)
- McINTOSH, P.R., PEACOCK, A.C., and GELBOIN, H.V.: The induction of liver microsomal proteins by 3-methylcholanthren in rats of different age, sex and strain. *Biochim. Biophys. Acta* 627, 290-300 (1980)
- MICHOT, F., BÜRGI, M. und BÜTNER, J.: Rimactan (Rifampicin) und Antikoagulantientherapie. *Schweiz. med. Wschr.* 100, 583-584 (1970)
- MISRA, P.S., LEFÈVRE, A., ISHII, H., RUBIN, E., and LIEBER, C.S.: Increase of ethanol, meprobamate and pentobarbital metabolism after chronic ethanol administration in man and rats. *Amer. J. Med.* 51, 346-351 (1971)
- MITOMA, Ch., POSNER, H.S., REITZ, H.C., and UDENFRIEND, S.: Enzymic hydroxylation of aromatic compounds. *Archs. Biochem. Biophys.* 61, 431-441 (1956)

- NASH, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantusch reaction. *Biochem. J.* 55, 416-421 (1953)
- NEBERT, D.W.: Changes in aryl hydrocarbon hydroxylase activity and microsomal P-450 during polycyclic hydrocarbon treatment of mammalian cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 36, 885-889 (1969)
- NEBERT, D.W.: Microsomal cytochromes b_5 and P-450 during induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in mammalian cell culture. *J. Biol. Chem.* 245, 519-529 (1970)
- NEBERT, D.W.: Multiple forms of inducible drug-metabolizing enzymes. A reasonable mechanism by which any organism can cope with adversity. *Mol. Cell. Biochem.*, 27, 27-46 (1979)
- NEBERT, D.W., and GIELEN, J.E.: Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mammalian liver cell culture. I. Effects of actinomycin D and cycloheximide on induction processes by phenobarbital or polycyclic hydrocarbons. *J. Biol. Chem.* 246, 5199-5206 (1971)
- NEBERT, D.W. and GIELEN, J.E.: Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in the mouse. *Fed. Proc.* 31, 1315-1325 (1972)
- NEBERT, D.W. and JENSEN, N.M.: The Ah locus: Genetic regulation of the metabolism of carcinogens, drugs, and other environmental chemicals by cytochrome P-450-mediated monooxygenases. In: *CRC Critical Reviews in Biochemistry* (Fasman, G.D., Ed.), pp. 401-437, CRC Press, Inc., Cleveland, Ohio, 1979
- NEBERT, D.W. and KON, H.: Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. Specific changes in spin state of cytochrome P-450 from genetically responsive animals. *J. Biol. Chem.* 248, 169-178 (1973)

- NEBERT, D.W., GOUJON, F.M. and GIELEN, J.E.: Genetic regulation of monooxygenase activity. In: Fonds de la Recherche Scientifique Medicale, pp. 240-270, Bruxelles , 1971
- NEBERT, D.W., GOUJON, F.M. and GIELEN, J.E.: Aryl hydrocarbon hydroxylase induction by polycyclic hydrocarbons: simple autosomal dominant trait in the mouse. *Nature- New Biol.* 236, 107-110 (1972)
- NEBERT, D.W., ROBINSON, J.R., NIWA, A., KUMAKI, K., and POLAND, A.P.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the mouse. *J. Cell. Physiol.* 85, 393-414 (1975)
- NEGISHI, M. and NEBERT, D.W.: Structural gene products of the Ah locus. Genetic and immunochemical evidence for two forms of mouse liver cytochrome P-450 induced by 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* in press (1979)
- NETTER, K.J., JENNER, S., und KAJUSCHKE, K.: Über die Wirkung von Metyrapon auf den mikrosomalen Arzneimittellabbau. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. Exp. Path. 259, 1-16 (1967)
- NETTER, K.J., KAHL, G.F. and MAGNUSSEN, M.P.: Kinetic experiments on the binding of metyrapone to liver microsomes. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 265, 205-215 (1969)
- NOCKE-FINK, L., BREUER, H. und REIMERS, D.: Wirkung von Rifampicin auf den Menstruationszyklus und die Östrogenausscheidung bei Einnahme oraler Antikonzeptiva. *Dtsch. med. Wschr.* 98, 1521-1523 (1973)
- OESCH, F.: Mammalian epoxide hydrolases: Inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica* 3, 305-340 (1973)

- OESCH, F. and DALY, J.: Conversion of naphthaline to trans-naphthaline dihydrodiol: Evidence for the presence of a coupled aryl monooxygenase-epoxide hydratase system in hepatic microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1713-1720 (1972)
- OESCH, F., JERINA, D.M., and DALY, J.: A radiometric assay for hepatic epoxide hydrase activity with [7-³H]-styrene oxide. *Biochim. Biophys. Acta* 257, 685-691 (1971)
- OHNISHI, K. and LIEBER, C.S.: Reconstitution of the microsomal ethanol-oxidizing system. Qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption. *J. Biol. Chem.* 252, 7124-7131 (1977)
- OKEY, A.B. and BONDY, G.P.: Diethylstilbestrol binding to estrogen receptor in mammary tissues and uteri of C3H/HeJ mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 61, 719-724 (1978)
- OKEY, A.B. and BONDY, G.P.: Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and 17 β -estradiol bind to different macromolecules in estrogen target tissues. *Science* 200, 312-314 (1978a)
- OKEY, A.B., BONDY, G.P., MASON, M.E., KAHL, G.F., EISEN, H.J., GUENTHNER, T.M., and NEBERT, D.W.: Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 254, 11636-11648 (1979)
- OMURA, T., and SATO, R.: A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, PC 1375-1376 (1962)
- OMURA, T., and SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2385 (1964)

- OMURA, T., SATO, R., COOPER, D.Y., ROSENTHAL, O., and ESTABROOK, R.W.: Function of cytochrome P-450 of microsomes. *Fed. Proc.* 24, 1181-1189 (1965)
- OSBORNE, M.R., THOMPSON, M.H., TARMY, E.M., BELAND, F.A., HARVEY, R. G., and BROOKES, P.: The reaction of 7,8-dihydroxybenzo(a)pyrene-9,10-oxide with DNA in relation to the benzo(a)pyrene-DNA products isolated from cells. *Chem.-biol. Interactions* 13, 343-348 (1976)
- PAIGEN, K.: The genetic control of enzyme activity during differentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 47, 1641-1649 (1961)
- PAIGEN, K.: Temporal genes and developmental programs. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.* 411, 33-42 (1977)
- PESSAYRE, D. and MAZEL, P.: Induction and inhibition of hepatic drug metabolizing enzymes by rifampin. *Biochem. Pharmacol.* 25, 943-949 (1976)
- PETERS, U., HAUSAMEN, T.-U., GROSSE-BROCKHOFF, F.: Einfluß von Tuberkulostatika auf die Pharmakokinetik des Digitoxins. *Dtsch med. Wschr.* 99, 2381-2386 (1974)
- PLEMPEL, M.: Probleme der Therapie mit modernen Antimykotika. *Münch. med. Wschr.* 118, Suppl. 1, 19-23 (1976)
- PLEMPEL, M., BARTMANN, K., BÜCHEL, K.H., und REGEL, E.: Experimentelle Befunde über ein neues, oral wirksames Antimykotikum mit breitem Wirkungsspektrum. *Dtsch. med. Wschr.* 26, 1356-1364 (1969)
- POLAND, A and GLOVER, E.: Chlorinated dibenzo-p-dioxins: Potent inducers of δ -aminolevulinic acid synthetase and aryl hydrocarbon hydroxylase. A study of the structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 9, 736-747 (1973)

- POLAND, A.P. and GLOVER, E.: Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, a potent inducer of aryl hydrocarbon hydroxylase, with 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.* 10, 349-359 (1974)
- POLAND, A. and GLOVER, E.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Evidence for a receptor mutation in genetically non-responsive mice. *Mol. Pharmacol.* 11, 389-398 (1975)
- POLAND, A. and GLOVER, E.: Chlorinated biphenyl induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity: a study of the structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 13, 924-938 (1977)
- POLAND, A.P., GLOVER, E., ROBINSON, J.R., and NEBERT, D.W.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P₁-450 formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice genetically "nonresponsive" to other aromatic hydrocarbons. *J. Biol. Chem.* 249, 5599-5606 (1974)
- POLAND, A., GLOVER, E., and KENDE, A.S.: Stereospecific high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence, that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 251, 4936-4946 (1976)
- POSNER, H.S., MITOMA, C., ROTHBERG, S., and UDENFRIEND, S.: Enzymic hydroxylation of aromatic compounds. III. Studies on the mechanism of microsomal hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 280-290 (1961)
- PUCA, G.A., NOLA, E., SICA, V., and BRESCIANI, F.: Estrogen-binding proteins of calf uterus. Partial purification and preliminary characterization of two cytoplasmic proteins. *Biochemistry* 10, 3769-3780 (1971)

- RAW, I. and MAHLER, H.R.: Studies of electron transport enzymes. III. Cytochrome b_5 of pig liver mitochondria. J. Biol. Chem. 234, 1867-1877 (1959)
- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmacol. 234, 279-290 (1959)
- REMMER, H.: Wirkungsänderungen von Arzneimitteln durch gegenseitige Störung ihrer Eiweißbindung und ihres Abbaus. Dtsch. med. Wschr. 99, 413-419 (1974)
- REMMER, H. and MERKER, H.J.: Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum: Association with drug-metabolizing enzymes. Science 142, 1657-1658 (1963)
- REMMER, H. und MERKER, H.J.: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal). Klin. Wschr. 41, 276-283 (1963a)
- REMMER, H. and MERKER, H.J.: Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 123, 79-97 (1965)
- REMMER, H., SCHENKMAN, J., ESTABROOK, R.W., SASAME, H., GILLETTE, J., NARASIMHULU, S., COOPER, D.Y., and ROSENTHAL, O.: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Mol. Pharmacol. 2, 187-190 (1966)
- REMMER, H., ESTABROOK, R.W., SCHENKMAN, J., and GREIM, H.: Reaction of drugs with microsomal hydroxylases: Its influence on drug action. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Exp. Path. 259, 98-116 (1968)

- REMMER, H., SCHOENE, B., and FLEISCHMANN, R.A.:
Induction of the unspecific microsomal hydroxylase in the human liver. *Drug. Metab. Disposition* 1, 224-230 (1973)
- ROBINSON, R.J., CONSIDINE, N., and NEBERT, D.W.:
Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. Evidence for the involvement of other genetic loci. *J. Biol. Chem.* 249, 5851-5859 (1974)
- ROOTS, I., LEY, B., and HILDEBRAND, A.G.: *In vivo* parameters of drug metabolism - differences in specificity towards inducing agents. pp. 581-588
In: *Microsomes and Drug Oxidations*, V. Ullrich, I. Roots, A. Hildebrandt, R.W. Estabrook and A.H. Conney (eds.), Pergamon Press, Oxford and New York, 1977
- RUBIN, E., HUTTERER, F., and LIEBER, C.S.: Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drug metabolizing enzymes. *Science*, N.Y. 159, 1469-1470 (1968)
- RYAN, D., LU, A.Y.H., KAWALEK, J., WEST, S.B., and LEVIN, W.: Highly purified cytochrome P-448 and P-450 from rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 64, 1134-1141 (1975)
- RYAN, D.E., THOMAS, P.E., KORZENIOWSKY, D., and LEVIN, W.: Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* 254, 1365-1376 (1979)
- SACHS, L.: *Angewandte Statistik*, Springer Verlag Berlin, 2. Auflage 1969, S. 293-294

- SCHARMA, R.N., CAMERON, R.G., FARBER, E., GRIFFIN, M.J., JOLY, J.-G., and MURRAY, R.K.: Multiplicity of induction patterns of rat liver microsomal mono-oxygenases and other polypeptides produced by administration of various xenobiotics. *Biochem. J.* 182, 317-327 (1979)
- SCHIMKE, R.T.: The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. *J. Biol. Chem.* 239, 3808-3817 (1964)
- SCHOENE, B., FLEISCHMANN, R.A., REMMER, H., and v. OLDERSHAUSEN, H.F.: Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 4, 65-73 (1972)
- SCHWARTZ, D.: Genetic studies on mutant enzymes in maize. III. Control of gene action in the synthesis of pH 7.5 esterase. *Genetics* 47, 1609-1615 (1962)
- SCHUT, H.A.J. and THORGEIRSSON, S.S.: *In vitro* metabolism and mutagenic activation of 2-acetylaminofluorene by subcellular liver fraction from cotton rats. *Cancer Res.* 38, 2501-2507 (1978)
- SHARMA, R.N., CAMERON, R.G., FARBER, E., GRIFFIN, M.J., JOLY, J.-G., and MURRAY, R.K.: Multiplicity of induction patterns of rat liver microsomal mono-oxygenases and other polypeptides produced by administration of various xenobiotics. *Biochem. J.* 182, 317-327 (1979)
- SLADEK, N.E. and MANNERING, G.J.: Evidence for a new hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 24, 668-674 (1966)

- SLADEK, N.E. and MANNERING, G.J.: Induction of drug metabolism. I. Differences in the mechanism by which polycyclic hydrocarbons and phenobarbital produce their inductive effects on microsomal N-demethylating systems. *Mol. Pharmacol.* 5, 174-185 (1969)
- STRITTMATTER, C.F. and BALL, E.G.: The intracellular distribution of cytochrome components and of oxidative enzyme activity in rat liver. *J. Cellul. Comp. Physiol.* 43, 57-78 (1954)
- STROBEL, H.W., LU, A.Y.H., HEIDEMA, J., and COON, M.J.: Phosphatidylcholine requirement in the enzymic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 245, 4851-4854 (1970)
- SYVÄLAHTI, E.K., PIHLAJAMÄKI, K.K., and IISALO, E.J.: Rifampicin and drug metabolism. *Lancet* 1974 II, 232-233
- SZABO, S., KOUROUNAKIS, P., SELYE, H., and DaSILVA, O.: Pharmacodynamic interactions among gluco-, mineralo- and glucomineralocorticoids, pregnenolone-16 α -carbonitrile and various drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188, 45-54 (1974)
- SZEBERÉNYI, Sz., SZALAY, K.Sz. and GARATTINI, S.: Daily rhythm of metyrapone metabolism in rats. *Biochem. Pharmacol.* 18, 2767-2769 (1969)
- TETTENBORN, D.: Toxizität und enzyminduzierende Aktivität von Clotrimazol. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.* 266, 468-469 (1970)
- TETTENBORN, D.: Akute Toxizität und lokale Verträglichkeit von Clotrimazol. *Arzneimittel-Forsch.* 22, 1272-1276 (1972)

- THOMAS, P.E., LU, A.Y.H., RYAN, D., WEST, S.B., KAWALEK, J., and LEVIN, W.: Immunochemical evidence for six forms of rat liver cytochrome P-450 obtained using antibodies against purified rat liver cytochromes P-450 and P-448. *Mol Pharmacol.* 12, 746-758 (1976)
- THOMAS, P.E., RYAN, D., and LEVIN, W.: An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 75, 168-176 (1976a)
- THOMAS, R.C. and IKEDA, G.J.: The metabolic fate of tolbutamide in man and in the rat. *J. med. Chem.* 9, 507-518 (1966)
- TOOLAN, H.W. and LEDINKO, N.: Effect of rifampicin on the development of tumors induced by adenovirus in male hamsters. *Nature - New Biol. (Lond.)* 237, 200-202 (1972)
- TUCHWEBER, B., WERRINGLOER, J., and KOUROUNAKIS, P.: Effect of phenobarbital or pregnenolone-16 α -carbonitrile on acute carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. *Biochem. Pharmacol.* 23, 513-518 (1974)
- ULLRICH, V. and KREMERS, P.: Multiple forms of cytochrome P-450 in the microsomal monooxygenase system. *Arch. Toxicol.* 39, 41-50 (1977)
- ULLRICH, V. and WEBER, P.: The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1171-1177 (1972)
- ULLRICH, V., WEBER, P., and WOLLENBERG, P.: Tetrahydrofuran - an inhibitor for ethanol - induced liver microsomal cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 808-815 (1975)

- VILLENEUVE, J.-P., MAVIER, P., and JOLY, J.-G.: Ethanol-induced cytochrome P-450: catalytic activity after partial purification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 723-728 (1976)
- WARNER, M., LaMARCA, M.V., and NEIMS, A.H.: Chromatographic and elektrophoretic heterogeneity of the cytochromes P-450 solubilized from untreated rat liver. *Drug Metab. Disposition* 6, 353-362 (1978)
- WEBER, K. and OSBORNE, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412 (1969)
- WELTON, A.F. and AUST, S.D.: Multiplicity of cytochrome P-450 hemoproteins in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 56, 898-906 (1974)
- WELTON, A.F., O'NEAL, F.O., CHANEY, L.C., and AUST, S.D.: Multiplicity of cytochrome P-450 hemoprotein in rat liver microsomes: preparation and specificity of an antibody to the hemoprotein induced by phenobarbital. *J. Biol. Chem.* 250, 5631-5639 (1975)
- WIEBEL, F.J., LEUTZ, J.C., DIAMOND, L., and GELBOIN, H.V.: Aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase in microsomes from rat tissues: Differential inhibition and stimulation by benzoflavones and organic solvents. *Archs. Biochem. Biophys.* 144, 78-86 (1971)
- WILLIAMS, C.H. Jr. and KAMIN, H.: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.* 237, 587-595 (1962)
- WOOD, A.W., LEVIN, W., LU, A.Y.H., YAGI, H., HERNANDEZ, O., JERINA, D.M., and CONNEY, A.H.: Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene derivatives to mutagenic products by highly purified hepatic microsomal enzymes. *J. Biol. Chem.* 251, 4882-4890 (1976)

- YANG, C.S.: Interactions between solubilized cytochrome P-450 and hepatic microsomes. J. Biol. Chem. 252, 293-298 (1977)
- ZILLY, W., BREIMER, D.D. and RICHTER, E. : Induction of drug metabolism in man after rifamicin treatment measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance. Europ. J. clin. Pharmacol. 9, 219-227 (1975)
- ZILLY, W., BREIMER, D.D. and RICHTER, E.: Stimulation of drug metabolism by rifampicin in patients with cirrhosis or cholestasis measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance. Europ. J. clin. Pharmacol. 11, 287-293 (1977)

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit sind in folgenden
Publikationen veröffentlicht:

- KAHL, G.F., FRIEDERICI, D.E., BIGELOW, S.W., OKEY, A.B.
and NEBERT, D.W.: Ontogenetic expression of regulatory
and structural gene products associated with the
Ah locus. Comparison of rat, mouse, rabbit and
Sigmodon hispidus. Dev. Pharmacol. Ther. 1, 137-162
(1980)
- KAHL, R., FRIEDERICI, D.E., Kahl, G.F., RITTER, W.,
and KREBS, R.: Clotrimazole as an inhibitor of
benzo(a)pyrene metabolite-DNA adduct formation
in vitro and of microsomal monooxygenase activity.
Drug Metab. Disposition, in press (1980)

L e b e n s l a u f

Am 17. Oktober 1949 wurde ich als Tochter des Prof. Dr. med. Lothar Friederici und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Mannherz in Köln geboren. Nach vier-jähriger Volksschulzeit besuchte ich ab 1960 das Frauenlob-Gymnasium in Mainz. 1965 wechselte ich auf das Hollenberg-Gymnasium in Waldbröl über und legte dort am 10. Juni 1968 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1968/69 nahm ich das Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz auf und bestand im April 1972 die Vordiplom-Prüfung. Im Oktober 1974 begann ich am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Radler mit der Anfertigung des experimentellen Teils meiner Diplomarbeit und erhielt am 6.4.1976 den Grad eines Diplom-Biologen.

Seit September 1976 bin ich im Pharmakologischen Institut der Universität Mainz bei Herrn Prof. Dr. G.F. Kahl mit der Bearbeitung des vorliegenden Themas beschäftigt. Ein Teil der Ergebnisse wurde während eines - durch ein Auslandsstipendium der Graduiertenförderung finanzierten - Forschungsaufenthaltes bei Dr. D.W. Nebert an den National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, von Februar bis Mai 1979 erarbeitet.

